

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Weihe
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Abteilung Molekulare Zellbiologie: Prof. Dr. J. Seitz

Funktionelle Charakterisierung von Peroxisomen in murinen Oozyten



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Hendrik Fleischer
aus Waiblingen

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am: 15.04.2011.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Georg H. Lüers
1. Korreferent:	Prof. Dr. Gerhard Schratt

Meiner Familie gewidmet

Für Jennifer Philipp

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Peroxisomen	1
1.1.1 Entdeckung	1
1.1.2 Aufbau	1
1.1.3 Biogenese	2
1.1.4 Peroxine und Matrixproteinimport	2
1.1.5 Metabolische Funktion	3
1.1.6 Metabolismus Reaktiver Sauerstoffverbindungen	4
1.1.7 Oxidation	6
1.1.7.1 β -Oxidation	6
1.1.7.2 α -Oxidation	7
1.1.8 Etherlipidsynthese	8
1.1.9 Membranproteine	8
1.1.10 Klinische Bedeutung peroxisomaler Defekte	9
1.2 Die Oozyte	10
1.2.1 Oogenese	10
1.2.2 Follikulogenese	11
1.3 Peroxisomen in Keimzellen	13
 2. ZIELSETZUNG	 15
 3. MATERIAL UND METHODEN	 16
3.1 Versuchstiere	16
3.1.1 Herkunft	16
3.1.2 Herkunft transgener Mäuse mit peroxisomaler GFP-Expression	16
3.1.3 Optimale Bedingungen des ovariellen Zyklus	17

3.2 Chemikalien und Geräte	17
3.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	17
3.2.2 Kits	19
3.2.3 Geräte	19
3.3 Entnahme, Fixierung und Aufbereitung der Ovarien	21
3.3.1 Tötung der Versuchstiere	21
3.3.2 Perfusionsfixierung	21
3.3.3 Entnahme der Ovarien	22
3.3.4 Immersionsfixierung	23
3.3.5 Fortgang der Immersionsfixierung für Paraffinschnitte	23
3.3.5.1 Auswaschung und Dehydration	23
3.3.5.2 Paraffin-Einbettung	24
3.3.6 Fortgang der Immersions- und Perfusionsfixierung für Kryoschnitte	25
3.3.7 Herstellung von Gewebeschnitten	25
3.3.7.1 Beschichten der Objektträger	25
3.3.7.2 Paraffinschnitte	26
3.3.7.3 Kryoschitte	26
3.4 Histologische Färbungen	26
3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)	26
3.5 Immunfluoreszenzmarkierung peroxisomaler Proteine	28
3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz	28
3.5.2 Primärantikörper	28
3.5.3 Sekundärantikörper	29
3.5.3.1 DAPI-Färbung	29
3.5.4 Markierung in Paraffinschnitten	29
3.5.4.1 Erster Tag	30
3.5.4.2 Zweiter Tag	31
3.5.5 Markierung in Kryoschnitten	32
3.5.5.1 Erster Tag	32
3.5.5.2 Zweiter Tag	32
3.5.6 Kontrollen der Immunfluoreszenzmarkierung	32
3.5.7 Fotodokumentation	32

3.5.8 Elektronenmikroskopie	33
3.5.9 Bildbearbeitung	34
3.6 Isolierung von Oozyten	35
3.6.1 Präparation der Ovarien	35
3.6.2 Zerkleinerung und Separation des Gewebes	35
3.6.3 Picken der Oozyten	36
3.6.4 Zwischenlagerung	38
3.7 Molekularbiologische Methoden	38
3.7.1 RNA-Präparation	38
3.7.2 cDNA-Synthese	38
3.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
3.7.3.1 Durchführung	41
3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese	42
3.7.4.1 Durchführung	43
3.7.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion (QPCR)	44
3.7.5.1 Durchführung	45
3.7.5.2 Auswertung	46
3.7.6 Oligonukleotide (Primer)	47
 4. ERGEBNISSE	 51
4.1 Übersicht	51
4.2 Etablierung von optimalen Bedingungen für die	
Untersuchung von Follikeln	52
4.2.1 Vergleich von Fixierlösungen	53
4.3 Analyse der Immunfluoreszenzmarkierung peroxisomaler	
Proteine in Ovarien der Maus	54
4.3.1 Optimale Bedingungen und Antikörperverdünnungen	54
4.3.2 Einfluss von Einbettung und Fixierung auf die	
Immunhistochemie	55
4.3.2.1 Paraffineinbettung und Kryokonservierung	55
4.3.2.2 Perfusionsfixierung und Immersionsfixierung	56
4.3.2.3 Kontrollen der Immunfluoreszenzmarkierung	57

4.3.3 Oozytäre Peroxisomen enthalten Katalase, Abcd3 und Pex14	59
4.3.4 Peroxisomen proliferieren im Verlauf der Follikelreifung	61
4.3.5 GFP kolokalisiert mit peroxisomalen Markerproteinen in GFP-PTS1-transgenen Mäusen	63
4.3.6 Elektronenmikroskopische Darstellung GFP-markierter Peroxisomen	64
4.4 Analyse der Oozytären Genexpression durch quantitativen	
Nachweis von mRNA	66
4.4.1 Repräsentative Oozyten-mRNA-Pools	67
4.4.2 Reinheit der Oozyten-Präparation	68
4.4.3 Analyse der mRNA Expression Peroxisomen- bezogener Gene	71
4.4.4 Verminderter Metabolismus reaktiver Sauerstoffverbindungen	74
4.4.5 Vergleichbare Expressionslevel bei der Biogenese	75
4.4.6 Deutliche Reduktion der Oxidation	77
4.4.7 Starke Ausprägung der Etherlipidsynthese in den Peroxisomen der Oozyte	79
4.4.8 Unterschiedliche Expression der Membranproteine	81
 5. DISKUSSION	83
5.1 Überblick	83
5.2 Zunahme der Peroxisomendichte	83
5.3 Morphologie der Peroxisomen in Oozyten	84
5.4 Anreicherung der Oozyten-spezifischen Gene Zp1 und Oosp1	85
5.5 Reduktion der nicht oozytären Gene Lhcgr und Fshr	86
5.6 Gapdh als house-keeping Gen	87
5.7 Expressionsmuster Peroxisomen-bezogener Gene in Oozyten	88
5.8 Bedeutung der Etherlipide für die Oozyte	89

5.9 Deutliche peroxisomale Biogenese bei Reduktion der peroxisomalen Hauptfunktionen	90
5.10 Ausblick	91
 6. ZUSAMMENFASSUNGEN	92
6.1 Deutsche Zusammenfassung	92
6.2 English Summary	94
 7. LITERATURVERZEICHNIS	96
 8. ANHANG	107
8.1 Abkürzungsverzeichnis	107
8.2 Wertetabelle QPCR	110
8.3 Abbildungsverzeichnis	111
8.4 Tabellenverzeichnis	112
8.5 Verzeichnis akademischer Lehrer	114
8.6 Tabellarischer Lebenslauf	115
8.7 Danksagung	117
8.8 Ehrenwörtliche Erklärung	118

1. EINLEITUNG

1.1 Peroxisomen

1.1.1 Entdeckung

Peroxisomen wurden erstmals in den 1950er Jahren als „microbodies“, also als winzige Körperchen, nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (Rhodin 1954) beschrieben. Durch den Biochemiker Christian De Duve, der den Zusammenhang bestimmter Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bildender Enzyme, den Oxidasen, und der, das H_2O_2 wieder abbauenden, Katalase in eigenständigen Zellorganellen erkannte (De Duve et al. 1960), erhielten 1965 die Peroxisomen ihren heutigen Namen (De Duve and Baudhuin 1966). 1974 erhielt de Duve für die Entdeckung der Peroxisomen und die erstmalige Beschreibung weiterer Zellorganellen, der Lysosomen, den Nobelpreis für Medizin.

1.1.2 Aufbau

Peroxisomen sind kugelförmige oder seltener auch schlauchförmige Zellorganellen mit einer Größe von 100 nm bis 1,5 μm . Sie kommen in nahezu allen eukaryotischen Zellen vor, wobei ihre Größe, Gestalt, Häufigkeit und enzymatische Ausstattung stark variiert. Peroxisomen enthalten keine eigene DNA und keine Ribosomen und sind somit auf den Proteinimport aus dem Cytosol angewiesen. Umgeben sind sie von einer einschichtigen Doppelmembran. Unter dem Elektronenmikroskop ist im Innern eine feingranuläre Matrix sichtbar. Peroxisomen sind sehr dynamische Zellorganellen und spielen eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel. Inzwischen sind mehr als 50 metabolische Enzyme und 30 bis 40 an Biogenese und Proteinimport beteiligte Enzyme bekannt. Die enzymatische Ausstattung der Peroxisomen ist auch von den metabolischen Gegebenheiten, sowie von Spezies und Zelltyp abhängig. Somit kann die peroxisomale Funktion umgebungsbedingten Änderungen und Bedürfnissen der Zellen angepasst

werden, weshalb sie auch als „multifunktionelle Organellen“ bezeichnet werden (Opperdoes 1987).

1.1.3 Biogenese

Bis heute ist die Entstehung von Peroxisomen noch nicht eindeutig geklärt. Peroxisomen sind sehr dynamische Zellorganellen bei deren Biogenese drei Aspekte unterschieden werden. Dies sind der Aufbau der peroxisomalen Membran, der Import von Matrixproteinen und die Proliferation von Peroxisomen. Peroxisomale Matrixproteine werden an freien Ribosomen synthetisiert und danach in die Peroxisomen oder deren Vorläufervesikel importiert (Goldman and Blobel 1978; Robbi and Lazarow 1982). Peroxisomen gelten als autonome Organellen, die sich durch Wachstum und Teilung vermehren (Lazarow and Fujiki 1985). An der Biogenese von Peroxisomen wirken eine Reihe von peroxisomalen Proteinen, die Peroxine (Pex) genannt und in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert wurden (Distel et al. 1996), mit. Peroxine sind auch am Proteinimport von peroxisomalen Matrixproteinen beteiligt. Der Proteinimport für Matrixproteine und Membranproteine geschieht mittels spezieller peroxisomaler „targeting“ Signale (PTS). Durch dieses PTS erfolgt die Erkennung der im Zellkern kodierten und an freien Ribosomen synthetisierten Proteine für die Peroxisomen. Hierbei sind zwei Varianten bekannt. Zum Einen PTS 1, ein aus drei Aminosäuren (AS) bestehendes Signalpeptid am C-terminalen Ende (Gould et al. 1989) eines Proteins. Dieses wird vom cytosolischen Rezeptor Pex5 erkannt und der Komplex zum Peroxisom transportiert (Fransen et al. 1995). Seltener ist PTS 2, ein komplexeres Signalpeptid am N-terminalen Ende von Proteinen (Petriv et al. 2004), welches vom cytosolischen Rezeptor Pex7 erkannt wird. Bis heute ist jedoch noch nicht vollständig geklärt woher die Membran der Peroxisomen stammt. Das ER scheint aber als Lieferant eine entscheidende Rolle zu spielen (Tabak et al. 2003).

1.1.4 Peroxine und Matrixproteinimport

Der am Besten untersuchte Aspekt der peroxisomalen Biogenese ist der Matrixproteinimport. Bemerkenswert ist hierbei, dass der Import bereits

gefalteter, teilweise an Kofaktoren gebundener und sogar oligomerer Proteine erfolgt (Glover et al. 1994; McNew and Goodman 1994). Der Import kann in vier Teilschritte gegliedert werden. Wie bereits beschrieben kann Pex5 das PTS 1 und Pex7 das PTS 2 der zu importierenden peroxisomalen Matrixproteine im Cytoplasma erkennen. Die so markierten Enzyme docken anschließend an spezifische Proteine der Peroxisomenmembran (Rezeptor-docking-Komplex) an und es kommt zur Translokation durch die Membran in die peroxisomale Matrix. Abschließend gelangen die Rezeptoren wieder ins Cytosol, um für einen erneuten Import zur Verfügung zu stehen (Dodt and Gould 1996). Die drei Peroxine Pex13, Pex14 und das periphere Membranprotein Pex17 bilden den Rezeptor-docking-Komplex (Brown and Baker 2008). Die Funktion von Pex17 ist hierbei nicht endgültig geklärt, es assoziiert aber mit Pex14 (Huhse et al. 1998). Pex13 und Pex14 erkennen die beiden Importrezeptoren Pex5 und Pex7 (Girzalsky et al. 2009). Der genaue Mechanismus der Translokation der Proteine durch die peroxisomale Membran ist noch unklar. Nach Passage der Membran wird das transportierte Protein ins Lumen abgegeben. Pex8 ist an der Bindung des Rezeptor-docking-Komplexes mit einem peroxisomalen RING-Finger-Komplex aus Pex2, Pex10 und Pex12 beteiligt. Dieser Multiproteinkomplex wird auch „Importomer“ genannt (Agne et al. 2003). Unklar bleibt der exakte biochemische Mechanismus der Proteinfreisetzung, wohingegen die Rückbeförderung der Rezeptoren ins Cytosol im Anschluss an die Freisetzung der Proteine unzweifelhaft ist. Grundvoraussetzung für die Rückführung ist eine Markierung des Rezeptors mit Ubiquitin (Carvalho et al. 2007; Platta et al. 2007). Der letzte Schritt des Zyklus ist dann die Rezeptorfreisetzung aus der peroxisomalen Membran ins Cytosol. Dieser beginnt dort entweder einen neuen Importzyklus oder wird im Proteasom abgebaut.

1.1.5 Metabolische Funktion

Funktionell sind Peroxisomen an vielen verschiedenen Stoffwechselwegen beteiligt. In allen Organismen hat hierbei die β -Oxidation von Fettsäuren und der Metabolismus reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS, engl. reactive oxygen species), mit dem Abbau von Wasserstoffperoxid, eine zentrale

Position. Während der Abbau von Fettsäuren in den meisten Organismen eine exklusiv peroxisomale Funktion ist (Poirier et al. 2006), geschieht dies in Säugetier-Zellen in Mitochondrien und Peroxisomen. Daneben sind Peroxisomen an der α -Oxidation und einer Reihe wichtiger synthetischer Stoffwechselwege, wie der Etherlipidsynthese, beteiligt. Die Rolle bei der Synthese von Isoprenoiden, wie Cholesterol, ist nicht endgültig geklärt. Hierbei wurde die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), das Schlüsselenzym der Biosynthese von Cholesterol (Keller et al. 1985) und weitere Enzyme (Kovacs et al. 2002) zuerst nicht mehr ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER), sondern auch in Peroxisomen nachgewiesen. Bei anderen Untersuchungen der Enzyme Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonat-Kinase und Mevalonat-Pyrophosphate-Decarboxylase, wurde deren ausschließlich cytosolische Lokalisation bewiesen (Hogenboom et al. 2004a, b, c). Andere metabolische Funktionen von Peroxisomen sind die Beteiligung am Metabolismus von Purinen, z.B. durch Xanthinoxidase (Angermüller et al. 1987) und Uratoxidase (Volkl et al. 1988), sowie die Beteiligung am Metabolismus von Proteinen und Aminosäuren (Masters 1997), an der Degradation von Polyaminen (Van den Munckhof et al. 1995) und am Hexosemonophosphat-Weg (Antonenkova 1989).

1.1.6 Metabolismus Reaktiver Sauerstoffverbindungen

Reaktive Sauerstoffverbindungen sind schädliche Formen des O_2 . Sie entstehen vermehrt unter oxidativem Stress z.B. verursacht durch Umweltgifte, Schwermetalle, Ionisierung, UV-Strahlung oder Entzündungen (Ermak and Davies 2002). ROS nehmen somit bei vielen pathophysiologischen Prozessen eine wesentliche Rolle ein. Schädigend wirken sie vor allem auf DNA, Proteine und Lipide. Neben Mitochondrien enthalten auch Peroxisomen eine Reihe von Oxidasen, die einen erheblichen Teil des oxidativen Stress einer Zelle verursachen (Schrader and Fahimi 2004). So konnte gezeigt werden, dass in der Leber der Ratte ungefähr 35 % des gesamten H_2O_2 durch peroxisomale Oxidasen entstehen (Boveris et al. 1972). Andererseits können ROS und RNS (engl. reactive nitrogen species) auch an vielen physiologischen Zellprozessen als Mediatoren, oder an diversen Signalkaskaden der Zelle, beteiligt sein

(Droge 2003; Saran 2003). Der Abbau entstandener ROS und RNS wie H_2O_2 , Superoxidanion ($\cdot\text{O}_2^-$) oder Nitritoxid ($\cdot\text{NO}$) erfolgt durch eine Reihe peroxisomaler Enzyme, unabhängig davon, ob die Radikale innerhalb oder außerhalb der Peroxisomen gebildet wurden. Die Tatsache, dass Peroxisomen an der Produktion von ROS und RNS (Stolz et al. 2002) beteiligt sind, sowie ihre Ausstattung mit charakteristischen ROS und RNS verstoffwechselnden Enzymen, zeigt welche Schlüsselrolle diese ubiquitären Organellen im Metabolismus reaktiver Sauerstoffverbindungen und RNS einnehmen. Die antioxidativen Enzyme in Säugetier-Peroxisomen sind in Tab. 1.1 aufgelistet.

Tab. 1.1: ROS abbauende Enzyme nach (Schrader and Fahimi 2006)

Enzym	Substrat
Katalase	H_2O_2
Glutathion Peroxidase	H_2O_2
Cu/Zn Superoxid Dismutase 1	$\cdot\text{O}_2^-$
Mn Superoxid Dismutase 2	$\cdot\text{O}_2^-$
Epoxid Hydrolase	Epoxide
Peroxiredoxin I	H_2O_2
Peroxiredoxin V (Pmp20)	H_2O_2
Glutathion S-Transferase kappa	$\cdot\text{O}_2^-$

Prominentestes Enzym im Metabolismus reaktiver Sauerstoffverbindungen ist die Katalase. Katalase ist das klassische Markerenzym für Peroxisomen. Seine enorme protektive Funktion gegen die toxischen Effekte von Peroxiden ergibt sich aus der hohen Effektivität mit der es diese abbauen kann (Siraki et al. 2002). Die Verstoffwechselung von H_2O_2 durch Katalase kann, je nach vorherrschenden Bedingungen, auf zwei unterschiedliche Weisen geschehen. Entweder katalytisch, wobei die direkte Aufspaltung in molekularen Sauerstoff und Wasser erfolgt ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$), oder aber peroxidativ, wobei der Abbau eines Moleküls H_2O_2 in zwei Moleküle Wasser mit der Oxidation verschiedener Wasserstoffdonoren (XH_2) wie Ethanol, Methanol, Phenol, Nitrit, etc. gekoppelt ist ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{XH}_2 \rightarrow \text{X} + 2\text{H}_2\text{O}$) (Oshino et al. 1973). Die Mangan Superoxid Dismutase (Sod2) ist ein 222 AS langes Homotetramer mit je einem

Manganion pro Untereinheit. Superoxiddismutasen inaktivieren Superoxidanionen zu H_2O_2 und O_2 . Sod2 ist neben der peroxisomalen Membran, wo sie eine Rolle für den Redoxstatus von Peroxisomen zu haben scheint (Singh et al. 1999), vor allem in Mitochondrien lokalisiert. Die Glutathion Peroxidase kommt in Peroxisomen (Singh et al. 1994) und im Cytosol vor. Glutathion Peroxidase katalysiert den Abbau von H_2O_2 indem es zwei Moleküle der reduzierten Form des Tripeptid Glutathion (GSH) durch eine Oxidation zum Disulfid (GSSH) verknüpft. Peroxisomen enthalten ebenfalls eine Glutathion S-Transferase Aktivität.

1.1.7 Oxidation

1.1.7.1 β -Oxidation

Zu den charakteristischen Stoffwechselfunktionen der Peroxisomen gehört die Beteiligung am Fettsäurestoffwechsel. Der Abbau von Fettsäuren, die β -Oxidation, erfolgt in höheren Eukaryonten in Mitochondrien und in Peroxisomen (Lazarow and De Duve 1976). In beiden Organellen läuft diese simultan ab und hat vier charakteristische Schritte. Zyklisch wiederholend werden nacheinander C2-Einheiten als Acetyl-CoA abgespalten. Hierzu erfolgt zuerst eine Dehydrierung des Acyl-CoA, eine Hydratisierung, erneut eine Dehydrierung und eine thioklastische Spaltung. Bei dieser entsteht Acetyl-CoA und ein um 2 C-Atome verkürztes Acyl-CoA (Lazarow 1978). Das Acetyl-CoA fließt z.B. in den Citrat-Zyklus ein, wo es weiter zu CO_2 und H_2O abgebaut wird. Die beiden β -Oxidation-Systeme unterscheiden sich durch die Substratspezifität. Dies hat auch eine unterschiedliche biologische Funktion zwischen der mitochondrialen und der peroxisomalen β -Oxidation zur Folge. Kurz- und mittelkettige Fettsäuren werden ausschließlich von Mitochondrien verstoffwechselt. Während langkettige Fettsäuren ebenfalls vorzugsweise in Mitochondrien abgebaut werden, können sehr langkettige Fettsäuren (VLCFA) ausschließlich in Peroxisomen β -oxidiert werden (Singh et al. 1984). Andere exklusiv von Peroxisomen verwertbare Substrate sind 2,4,6,10-Tetramethylpentadecansäure, langkettige Dicarbonsäuren, welche durch ω -Oxidation aus langkettigen Monocarbonsäuren entstehen, einige mehrfach ungesättigte Fettsäuren, bestimmte Prostaglandine und Leukotriene, einige Xenobiotika

sowie die Vitamine E und K (Wanders and Waterham 2006a). Des Weiteren entstehen die primären Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxycholsäure nach einem Zyklus β -Oxidation in Peroxisomen abgeleitet vom Cholesterol (Pedersen 1993).

Die erste Reaktion der peroxisomalen β -Oxidation ist katalysiert durch die Acyl-CoA-Oxidase (Acox) und gilt als limitierender Schritt dieses Stoffwechselweges. Die Peroxisomen von Säugetieren haben drei Acox-Varianten; erstens Acyl-CoA-Oxidase 1, Palmitoyl (Acox1, Aox), zweitens Acyl-CoA-Oxidase 2, branched chain (Acox2) und drittens Acyl-CoA-Oxidase 3, Pristanoyl (Acox3). Diese unterscheiden sich vornehmlich durch ihre jeweilige Substratspezifität. Bei Menschen ist das Acox3-Gen jedoch nicht funktionell (Vanhooren et al. 1997). Anschließend folgt eine Konversion des entstandenen 2-trans-Enoyl-CoA über 3-Hydroxyacyl-CoA zu 3-Ketoacyl-CoA. In Peroxisomen existieren zwei Enzyme, die jeweils Enoyl-CoA-Hydratase- und 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität besitzen und somit die beiden Schritte katalysieren. Daher leiten sich unterschiedliche Bezeichnungen für diese beiden Enzyme ab. Bekannt sind diese auch als L- bifunctional protein und D-bifunctional protein, als multifunctional enzyme oder multifunctional protein 1 und 2. Nachfolgend werden sie als Peroxisomales Bifunktionelles Enzym (Pbe) und als Multifunktionales Protein 2 (Mfp2) bezeichnet. Beide unterscheiden sich geringfügig durch ihre Substratspezifität (Dieuaide et al. 1996). Die abschließende thioklastische Spaltung erfolgt durch Thiolase A und Thiolase B oder durch die SCP-3/3-Oxoacyl-CoA-Thiolase (Scpx) (Seedorf et al. 1994). Thiolase A wurde zuerst in Peroxisomen der Rattenleber beschrieben (Hijikata et al. 1990). Thiolase A und Thiolase B unterscheiden sich kaum was ihre Substratspezifität betrifft und ihre Beteiligung an der peroxisomalen β -Oxidation von geraden Fettsäuren ist ausführlich beschrieben (Antonenkova et al. 1999).

1.1.7.2 α -Oxidation

Die α -Oxidation (Croes et al. 1996) dient dem Abbau methylverzweigter Fettsäuren. Fettsäuren mit einer Methylgruppe am C-3 (β -C-Atom) müssen zuerst einer α -oxidativen Decarboxylierung unterzogen werden, bevor sie in die β -Oxidation eingehen können. Bei Säugetieren wird die Fettsäure Phytansäure

auf diese Weise abgebaut, was beim Refsum-Syndrom nicht möglich ist (Wanders and Komen 2007; Wierzbicki 2007).

1.1.8 Etherlipidsynthese

Phospholipide haben im menschlichen Organismus eine komplexe Funktion und sind für das Leben von entscheidender Bedeutung. So haben sie beim Aufbau von Biomembranen eine bedeutende Rolle, sind membranständige ROS-scavenger, sind aber auch an der intrazellulären Signaltransduktion, am Cholesteroltransport und Cholesterolstoffwechsel und am Metabolismus mehrfach ungesättigter Fettsäuren beteiligt (Munn et al. 2003; Nagan and Zoeller 2001). Plasmalogene machen mehr als 80 % des Phospholipidgehalts der Weißen Substanz im Gehirn aus (Wanders and Waterham 2006b). Isolierte Enzymdefekte, z.B. der Dihydroxyacetonphosphat-Acyltransferase (Dhapat, Gnapat) und der Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase (Dhap-S, Alkyl-Dhap, Agps), führen zu schweren Fehlbildungen und zum frühen Tod. Wichtige Schritte der Biosynthese von Plasmalogenen, einer Teilgruppe der Phospholipide, sind in Peroxisomen lokalisiert. Die Biosynthese beginnt mit der Synthese von Acyl-Dhap aus Dhap (Dihydroxyacetonphosphat) und Acyl-CoA durch das peroxisomale Enzym Dhapat (Thai et al. 1997). Chinese hamster ovary (CHO) Zelllinien ohne eine funktionsfähige Dhapat können keine Plasmalogene synthetisieren (Wanders and Waterham 2006a). Als nächster Schritt erfolgt die Etherbindung eines Fettalkohols und es entsteht Alkyl-Dhap durch das ebenfalls peroxisomale Enzym Dhap-S (Singh et al. 1993). Die Reduktion von Alkyl-Dhap zu Alkylglycerol-3-Phosphat erfolgt durch die membrangebundene Acyl/Alkyl-Dhap-Reduktase, bevor die weiteren Schritte der Etherlipidsynthese im ER stattfinden.

1.1.9 Membranproteine

Die Membranen von Säugetier-Peroxisomen enthalten vier ATP-abhängige ABC-Transporter (ATP-binding cassette Transporter) Abcd1 (Aldp), Abcd2, Abcd3 (Pmp70) und Abcd4. ABC-Transporter stellen eine große Familie strukturell ähnlicher Proteine dar, welche durch Hydrolyse von ATP verschiedene Substrate über die Membran transportieren (Dean and Annilo

2005). Funktionelle ABC-Transporter bestehen aus zwei strukturell ähnlichen hydrophoben Hälften, welche jeweils sechs Transmembran α -Helices und eine hydrophile Nucleotid bindende Domäne enthalten (Wanders and Waterham 2006a). Abcd1 arbeitet als Homodimer und ist am Transport von Acyl-CoA-Estern über die Membran beteiligt (van Roermund et al. 2008). Grundlage für die Funktion des peroxisomalen Stoffwechsels ist ein ständiger Fluss von Metaboliten über die peroxisomale Membran. Weniger bekannt ist hierbei über den molekularen Transportmechanismus in Bezug auf kleine lösliche Teilchen. Für das integrale Membranprotein Pxmp2 wurde gezeigt, dass es einen transmembranen Kanal formen kann, welcher als Größen-selektiver Filter für lösliche Teilchen bis ca. 0,6 kDa fungiert. Somit scheint die Membran für kleinere Teilchen permeabel zu sein, während der Transfer größerer Metabolite wie z.B. Kofaktoren hierzu spezifische Transporter benötigt (Rokka et al. 2009).

1.1.10 Klinische Bedeutung peroxisomaler Defekte

Die immense und unverzichtbare Bedeutung von Peroxisomen für den menschlichen Stoffwechsel veranschaulichen Krankheiten, bei denen die Peroxisomen betroffen sind. Peroxisomale Defekte lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Gartner 2000). Zum einen gibt es die Defekte einzelner oder mehrerer peroxisomaler Enzyme, die zu verschiedenen Störungen des Stoffwechsels der Peroxisomen führen. Andererseits gibt es die Gruppe der PBDs (engl. peroxisome biogenesis disorders), bei welchen es zu Störungen der peroxisomalen Entwicklung kommt. Dadurch sind nicht nur einzelne Enzyme sondern der komplette peroxisomale Stoffwechsel betroffen. Grund hierfür ist, dass durch eine Mutation der Pex-Gene der Proteinimport involviert ist, was zu schweren Pathologien führt. Klinisch manifestiert sich dies bei den Erkrankungen des Zellweger-Syndrom-Spektrums mit dem Zellweger-Syndrom (Cerebro-hepato-renales Syndrom, ZS) als bekanntestem Vertreter, der neonatalen Adrenoleukodystrophie (NALD) und dem Infantilen M. Refsum (IRD). Diese haben ein ähnliches Symptomspektrum, wobei das ZS die schwerste Ausprägung ist, und bei NALD und IRD die Lebenserwartung zunehmend ansteigt. ZS Patienten weisen unter anderem eine generell herabgesetzte Muskelspannung (Hypotonie), eine psychomotorische

Retardierung mit Epilepsien, Blindheit, Taubheit sowie Ikterus mit Hepatomegalie, Leberfibrose und Nierenzysten auf. Zudem können Entwicklungsstörungen des Skeletts, der Genitalien und die Störung der Nebennierenrindenfunktion auftreten. Die Lebenserwartung liegt hierbei unter 12 Monaten. Ebenfalls zu den PBDs gehört die Rhizomelia chondrodysplasia punctata (RCDP). Diese Krankheiten werden autosomal rezessiv vererbt (Gould and Valle 2000).

Zu der zweiten Gruppe, bei welcher einzelne oder mehrerer peroxisomale Enzyme fehlen, gehört die x-chromosomal vererbte Adrenoleukodystrophie (X-ALD). Durch den Defekt an dem, mittlerweile Abcd1 (Moser 1993) genannten, ABC-Transporter für VLCFA, können diese sehr langkettigen Fettsäuren nicht in den Peroxisomen verstoffwechselt werden und akkumulieren vor allem in der Nebennierenrinde und der weißen Substanz. Dies führt dort zu teils erheblichen Funktionsverlusten. Für nahezu jedes der peroxisomalen Matrixenzyme ist ein entsprechender Defekt beschrieben worden. Gemeinsamer Pathomechanismus ist fast immer die Akkumulation von Stoffwechselvorstufen, die durch den jeweiligen Enzymdefekt nicht weiter metabolisiert werden können. Durch Ablagerung dieser Stoffwechselvorstufen in verschiedenen Organsystemen kommt es unter anderem zu den jeweiligen Symptommanifestationen.

1.2 Die Oozyte

1.2.1 Oogenese

Die Oozyte ist die weibliche Keimzelle. Sie ist sphärisch und reich an Cytoplasma. Ihre Entwicklung beginnt bereits früh im Embryonalstadium durch die Einwanderung von Urkeimzellen in die Gonadenanlage. Durch mehrfache mitotische Teilungen entstehen in der Rindenzone aus den Urkeimzellen Oogonien und durch deren Eintritt in die Meiose entstehen die primären Oozyten. Nach Durchlaufen der Prophasestadien Leptotän, Zygotän und Pachytän arretiert die primäre Oozyte im Diplotän, der Prophase der ersten meiotischen Teilung. Kurz vor der Geburt haben alle Oozyten im fetalen Ovar das Diplotänstadium erreicht. Es schließt sich ein Ruhestadium der Meiose, das Diktyotän an. Die primären Oozyten werden einzeln von einer einschichtigen

Lage von flachen Follikelepithelzellen eingeschlossen was nun als Primordialfollikel bezeichnet wird. Ab der Pubertät beenden periodisch mehrere primäre Oozyten die erste Reifeteilung. Durch die Beendigung der ersten Reifeteilung bis zur Ovulation entstehen aus der primären Oozyte die sekundäre Oozyte und das Polkörperchen. Zum Eisprung gelangen beim Menschen ca. alle 28 Tage nur einige wenige Oozyten. Hierbei erfolgt die zweite meiotische Teilung der Oozyte, bei welcher die Meiose in der Metaphase erneut verharret und erst nach der Befruchtung und somit der Fusion von Spermatozoon und Eizelle beendet wird. Die übrigen monatlich herangereiften Oozyten, sowie präpubertär in die Wachstumsphase eingetretene primäre Oozyten, werden atretisch. Der ovulierte Follikel entwickelt sich zum Corpus luteum, der sich im Falle einer Schwangerschaft zum Corpus luteum graviditatis weiterentwickelt und ansonsten durch Narbengewebe ersetzt wird (Corpus albicans). Durch die ständige Rekrutierung von Oozyten im Zyklus einer Frau nimmt die Anzahl mit zunehmendem Alter bis zum Zeitpunkt der Menopause stetig ab. Neuere Studien erwägen, dass auch im adulten Ovar unter bestimmten Umständen eine Neubildung von Oozyten möglich zu sein scheint (De Felici 2010). Der Zyklus der Maus ist poliöstrisch und mit einer Dauer von ungefähr vier Tagen wesentlich kürzer. Morphologisch können die Oozyten der Maus nach ihrer Größe in kleine Oozyten (Durchmesser bis 20 μm), in wachsende Oozyten (Durchmesser 20 μm bis 70 μm) und in große Oozyten (Durchmesser 70 μm) eingeteilt werden (Pedersen and Peters 1968).

1.2.2 Follikulogenese

Die Follikulogenese, also die Wachstumsphase des Follikels, erfolgt durch die Größenzunahme der Oozyte selbst und durch die Vermehrung der Anzahl der Follikelepithelzellschichten um die Oozyte und deren Proliferation. So können, unter dem Einfluss der Geschlechtshormone, aus Primordialfollikeln Primär-, Sekundär- und letztlich Tertiärfollikel heranreifen. Zwischen der innersten Schicht der Follikelepithelzellen und der Oozyte selbst bildet sich hierbei eine Schicht aus, die Zona pellucida. Die Zona pellucida ist eine extrazelluläre Matrix und besteht bei der Maus aus den drei Glykoproteinen Zp1, Zp2 und Zp3 (Bleil and Wassarman 1980). Die Genaktivierung durch FIG α während der

Follikulogenese führt zur Sekretion der drei Proteine (Soyal et al. 2000). Die Zona pellucida fungiert als Mediator bei der Befruchtung und ist für die Passage des Embryos durch den Ovidukt erforderlich (Rankin and Dean 2000). Die jeweilige Proteinexpression variiert in den unterschiedlichen Stadien der Follikulogenese, und ist spezifisch in Oozyten nicht jedoch in Granulosazellen nachweisbar (Epifano et al. 1995). Nach Außen sind die Follikelepithelzellen von einer dünnen Basalmembran umgeben. Beim Übergang zum Primärfollikel wird das Follikelepithel iso- bis hochprismatisch. Sekundärfollikel sind schon von einem mehrschichtigen Epithel umgeben (Stratum granulosum). Cytoplasma-Ausläufer der umliegenden Granulosazellen reichen durch die Zona pellucida hindurch, um die Versorgung der Oozyte zu gewährleisten. Das Stroma des Ovars organisiert sich außerhalb der Basalmembran zur Theca folliculi (interna und externa). Das weitere Wachstum zum Tertiärfollikel kennzeichnet sich unter anderem durch das Antrum folliculi, einem mit Liquor gefüllten Hohlraum. Die Oozyte liegt an dessen Rand im so genannten Cumulus oophorus, einem aus Granulosazellen gebildeten Hügel. Um den Follikel erfolgt die Differenzierung der hormonproduzierenden Theca interna (Östrogenproduktion) und der Theca externa. Ein sprungreifer Tertiärfollikel wird auch Graafscher Follikel genannt. Die Einteilung nach der morphologischen Erscheinung und der Follikelgröße erfolgte in Anlehnung an die Klassifizierung von Oozyten im Ovar der Maus von Pedersen (Pedersen and Peters 1968; Yoshida et al. 2009) in Primordial-, Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel (Abb. 1.1).

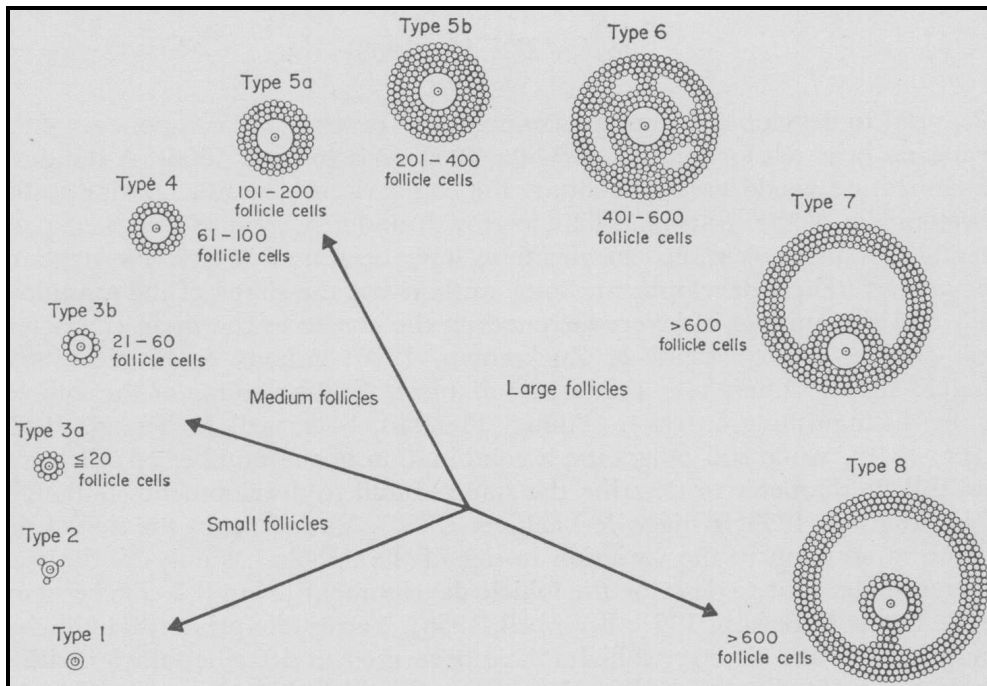


Abb. 1.1: Klassifizierung der Oozyten nach Pedersen und Peters (Pedersen and Peters 1968). Primordialfollikel: bis Typ 2, eine kleine Oozyte (Durchmesser bis 20 µm) ist von einzelnen Zellen umgeben; Primärfollikel: Typ 3a und Typ 3b ein kompletter Ring an Follikelepithelzellen umgibt eine kleine oder schon wachsende Oozyte (Oozyte 20 µm bis 70 µm); Sekundärfollikel: Typ 4 und Typ 5a die wachsende oder schon große Oozyte ist von zwei bis drei Zelllagen umgeben; Tertiärfollikel: ab Typ 5b mit großer Oozyte (Durchmesser 70 µm) und vielen Lagen Follikelepithelzellen und bis Typ 8 (Graafscher Follikel) zunehmend Liquor.

1.3 Peroxisomen in Keimzellen

Das Vorkommen und die Funktion von Peroxisomen in männlichen Keimzellen ist schon lange Gegenstand der Forschung. Hier zeigen Peroxisomen große Expressionsunterschiede und differente Enzymausstattung in verschiedenen Zellen. So sind in Sertoli-Zellen die Lipidtransporter Abcd1 und Abcd3, sowie das β -Oxidaseenzym Acox2 stark exprimiert, während in Leydig-Zellen Katalase und Abcd2 vermehrt exprimiert sind. Dies verdeutlicht die Zelltyp-spezifische Funktion von Peroxisomen und deren wichtige Rolle bei der Spermiogenese und im Lipidstoffwechsel der Sertoli-Zellen im Hoden (Nenicu et al. 2007). Während Peroxisomen in Spermatogonien noch wichtige Funktionen wahrnehmen, erfolgt während der Spermiogenese deren Degradation und sie

sind in reifen Spermatozoen nicht mehr vorhanden (Luers et al. 2006). 1972 wurden Peroxisomen im Ovar gravider und nicht gravider Mäuse in Luteinzellen, interstitiellen Zellen und Granulosazellen gezeigt (Bock 1972). Erst 2000 ist die Existenz von Peroxisomen-ähnlichen Strukturen in weiblichen Keimzellen in Oozyten der Ratte beschrieben (Figueroa et al. 2000) worden. Neben dem wagen Nachweis von Peroxisomen gibt es keine weiteren Untersuchungen was deren Funktion in weiblichen Keimzellen betrifft.

2. ZIELSETZUNG

In weiblichen Keimzellen ist die Existenz von Peroxisomen-ähnlichen Strukturen in Oozyten der Ratte beschrieben worden (Figueroa et al. 2000). Neben mangelnden Beweisen für die Existenz in Oozyten der Maus, ist insbesondere über die Funktion dieser Zellorganellen in den weiblichen Keimzellen bis heute nichts bekannt. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass reife Oozyten eine große Anzahl von Peroxisomen enthalten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese während der Follikelreifung proliferieren und eine bedeutende Rolle im Metabolismus der Oozyten einnehmen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die funktionelle Charakterisierung von Peroxisomen in Oozyten der Maus. Hierzu soll zuerst eine Optimierung der Methoden zum immunhistochemischen Nachweis peroxisomaler Proteine erfolgen. Anschließend soll die Analyse von Peroxisomen in Oozyten durch Immunfluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen peroxisomale Proteine möglich sein. Dadurch kann die Untersuchung von Form, Anzahl und Verteilung von Peroxisomen in Oozyten erfolgen. Ebenso soll eine Analyse der möglichen Veränderungen von Peroxisomen während der Follikelreifung durchgeführt werden. Nach der Etablierung von Methoden zur Analyse der mRNA Expression in Oozyten, soll die weitere Charakterisierung der Funktionen von oozytären Peroxisomen durch eine Expressionsanalyse Peroxisomen-bezogener Gene stattfinden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Herkunft

Für diese Arbeit benötigte Organe wurden Wildtyp Mäusen vom Stamm C57BL/6 und entsprechenden GFP-PTS1-transgenen Mäusen (Mm (C57BL/6)-GFP-PTS1) entnommen. Die ausschließlich weiblichen Tiere stammten aus eigener Zucht. Die Haltung und die Ernährung erfolgten nach Standardlaborbedingungen.

3.1.2 Herkunft transgener Mäuse mit peroxisomaler GFP-Expression

Im Vorfeld dieser Doktorarbeit wurden GFP-PTS1-transgene Mäuse in einer Kooperation mit David Otte und Andreas Zimmer vom Institut für molekulare Psychiatrie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn hergestellt. Das Transgen für die Herstellung dieser GFP-PTS1-transgenen Mäuse wurde dabei, durch Klonierung des GFP-PTS1-Gens in den Vektor pGHL230, unter die Kontrolle eines ROSA26-Promotors gebracht (Abb. 3.1). Die Mikroinjektion des gereinigten Transgens in fertilisierte Oozyten von FVB/N-Mäusen (Pronucleusinjektion) und der anschließende Embryotransfer in pseudoschwangere Weibchen, wurden nach Standardmethoden durchgeführt. Anschließend wurden die transgenen Mäuse mit FVB/N-Wildtyp-Mäusen (Jackson Laboratory) verpaart. Aus den entstandenen transgenen Mäusen wurde in unserem Labor ein Stamm für weitere Untersuchungen etabliert (Mm (FVB/N)-GFP-PTS1). Ein entsprechender C57BL/6-Stamm transgener Mäuse (Mm (C57BL/6)-GFP-PTS1) wurde von uns durch Rückkreuzung in den C57BL/6 Hintergrund erzeugt. Durch ein PCR-basiertes Genotypisierungsprotokoll mit Schwanz-DNA oder die direkte Fluoreszenzmikroskopie von Schwanzbiopsien konnten die transgenen Nachkommen analysiert werden.

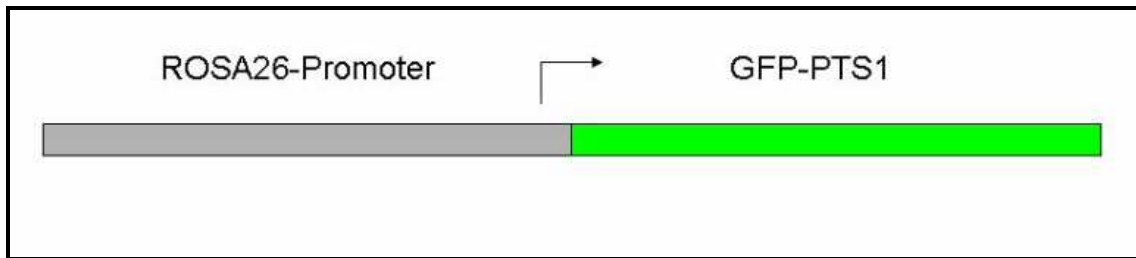


Abb. 3.1: Herstellung GFP-PTS1-transgener Mäuse. ROSA26-Promotor mit der kodierenden Sequenz für ein nachgeschaltetes GFP-PTS1-Fusionsprotein.

3.1.3 Optimale Bedingungen des ovariellen Zyklus

Um optimale Bedingungen für die Untersuchung von Stadien der murinen Follikelreifung zu etablieren, wurden die weiblichen Mäuse für unterschiedlich lange Zeiträume zusammen mit männlichen Tieren gehalten. Während eine Gruppe Mäuse in Käfigen mit verschiedengeschlechtlichen Tieren gehalten wurde, hatten die anderen Gruppen bis kurz vor der Entnahme der Ovarien nie Kontakt zu männlichen Tieren. Letztere wurden dann entweder 72 Stunden, 48 Stunden oder erst 24 Stunden vor Entnahme der Ovarien zu männlichen Artgenossen in die Käfige gesetzt.

3.2 Chemikalien und Geräte

3.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit benutzte Chemikalien und ihre Bezugsquellen sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 3.1):

Tab. 3.1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Aqua ad iniectionabilia (A.a.i.)	DeltaSelect, Pfullingen
Borsäure	KMF Laborchemie, Lohmar
Cell Dissociation buffer, enzyme free, PBS-based	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Gibco BRL, Eggenstein
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories, Pasching (Austria)
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Epon 812	Serva, Heidelberg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Riedel-de Haën, Seelze
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopentan (2-Methyl-butan)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchrom(III)-sulfat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumcacodylat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Osmiumtetroxid (OsO_4)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs (Schweiz)
Roti®-Block	Roth, Karlsruhe
Roti®-Immunoblock	Roth, Karlsruhe
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura-Finetek, Torrance, CA (USA)
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat	Serva, Heidelberg
Zedernholzöl	Merck, Darmstadt

Des Weiteren wurden die im Labor üblichen Verbrauchsmaterialien wie z.B. Pipettenspitzen, Save-Lock Reaktionsgefäße, Gewebekulturschalen, 76 mm x

26 mm Objektträger, Deckgläschen etc., wenn nicht anderes angegeben, von folgenden Firmen benutzt (Tab. 3.2):

Tab. 3.2: Verbrauchsmaterialien

Firma	Ort
Becton Dickinson	Heidelberg
Eppendorf	Hamburg
Abgene	Epsom (United Kingdom)
Greiner bio-one	Nürtingen
Menzel GmbH & Co KG	Braunschweig
Sarstedt	Nümbrecht
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA (USA)

3.2.2 Kits

Folgende kommerziell erhältliche Kits wurden verwendet (Tab. 3.3):

Tab. 3.3: Kits

Kit	Firma, Ort
Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix plus ROX Vial	Abgene, Epsom (United Kingdom)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, Burlington (Canada)
RNeasy Midi Kit	Quiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase Kit	Fermentas, Burlington (Canada)

3.2.3 Geräte

An der Durchführung der Arbeitsschritte oder bei der temporären Lagerung wurden die im Folgenden aufgelisteten Geräte benutzt (Tab. 3.4):

Tab. 3.4: Geräte

Gerät	Firma, Ort
Digital Camera DXM 1200F	Nikon, Düsseldorf
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss, Oberkochen

Fluoreszenzmikroskop DMRD+DMRE	Leica, Wetzlar
Freezer –86 °C	Forma
Hitzeversiegler ALPS 50 V	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA (USA)
Kryostat HM 5000	Microm, Walldorf
Kühlschrank KT1510	Liebherr, Biberach an der Riss
Magnetrührer RCT basic	Ika, Staufen
Mikrotom	Jung, Heidelberg
Mikrotom, Reichert Ultracut	Leica, Wetzlar
Mikroskop DMCS	Leica, Wetzlar
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Mikroskop CK 40	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
PCR-Block Thermo Hybaid PCR Express	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA (USA)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten Pipetman P2, P10, P20, P100, P200	Gilson, Middleton, WI (USA)
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Photometer, SmartSpec™ 3000	Bio-Rad, Hercules, CA (USA)
QPCR System Mx3000P	Stratagene, La Jolla, CA (USA)
Reaktionsgefäßständer	Brand, Wertheim
Schüttler	Ika, Staufen
Thermometer	Roth, Karlsruhe
T25 digital Ultra-Turrax	Ika, Staufen
Waage Adventurer Pro	Ohaus, Pine Brook, NJ (USA)
Waage Kern 470-36	Kern, Balingen
Wärmeschrank T6	Heraeus, Hanau
Werkbank für Zellkultur	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Universal 16 R	Hettich, Bäch (Schweiz)

3.3 Entnahme, Fixierung und Aufbereitung der Ovarien

3.3.1 Tötung der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Ausnahmen hiervon waren alle Mäuse, deren Ovarien mittels Perfusion fixiert wurden. Diese wurden zuerst mit Isofluran-Gas narkotisiert bevor sie, wie im Folgenden beschrieben, mit Fixans perfundiert wurden.

3.3.2 Perfusionsfixierung

Die zuvor narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage fixiert. Während der Kopf weiterhin in einem kleinen, mit Isofluran-Gas gefüllten, Gefäß lag, wurde die Bauchdecke mit einer Schere bis zum Processus xiphoideus eröffnet. Danach wurden die Rippen von kaudal nach kranial durchtrennt, um eine gute Sicht auf das Herz, sowie dessen Ein- und Ausflussbahnen zu erhalten. Nun wurde der linke Ventrikel des Herzens mit einer Schere eröffnet. Die Aorta wurde durch den linken Ventrikel katheterisiert und der Katheter wurde mit einer Klemme am Ventrikel fixiert. Nach der Durchtrennung der Arteriae pulmonales, wurde durch den Katheter kontinuierlich und vorsichtig eine zuvor auf 39 °C erwärmte Vorspüllösung (Tab. 3.5) infundiert. Nachdem der Körper weitgehend blutleer war, wurde 4%ige Paraformaldehyd (PFA)-Fixierungslösung (Tab. 3.6) über denselben Katheter injiziert. Die erfolgreiche Perfusion ließ sich vor allem am Farbwechsel der inneren Organe von eher rötlich nach gelblich-weiß erkennen. Nun konnten die Ovarien entnommen werden.

Tab. 3.5: Vorspüllösung

Inhaltsstoffe	Menge
Natriumchlorid (NaCl)	4,5 g
Procain	0,5 g
Liquemin	0,5 ml
Aqua dest.	ad 500 ml

Tab. 3.6: 4% PFA

Inhaltsstoffe	Menge
Paraformaldehyd	4 g
PBS (Tab. 3.7)	100 ml (bei 60 °C lösen)

Tab. 3.7: Phosphate Buffered Saline (PBS)

Inhaltsstoffe	Menge
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	1,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,3 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,7 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

3.3.3 Entnahme der Ovarien

Nach Tötung der nicht perfusionsfixierten Tiere wurden auch diese in Rückenlage fixiert. Die Bauchdecke wurde mit einer Schere eröffnet und die intraperitoneale Anteile des Darms wurden nach kranial verlagert. Die nun freiliegenden Uterushörner wurden auf jeder Seite bis zum Ende nach proximal verfolgt um das Ovar zu identifizieren. Eine Übersicht gibt Abb. 3.2. Die beiden Ovarien wurden entnommen und in Eppendorfgefäße zur weiteren Behandlung überführt.

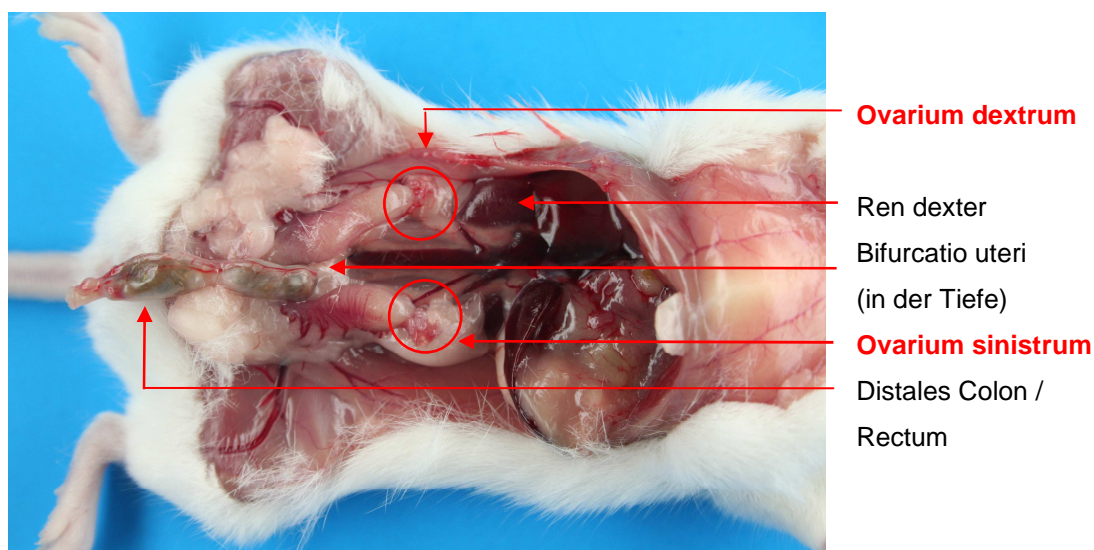


Abb. 3.2: Übersicht Maussitus nach Entfernung der Bauchdecke und des Darmtraktes.

3.3.4 Immersionsfixierung

Die entnommenen Organe wurden für mindestens 24 h in 2 ml Reaktionsgefäßen mit den unterschiedlichen Fixierlösungen durchfixiert. Hierbei wurde für Paraffinschnitte immer das jeweils linke Ovar einer Maus in Bouin-Fixierung (Tab. 3.8) und das jeweils rechte Ovar einer Maus in PFA-Fixierung gegeben.

Tab. 3.8: Bouin-Fixierung

Inhaltsstoffe	Menge
Gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	15 Teile
Formaldehydlösung (37 %)	5 Teile
Eisessig	1 Teil

3.3.5 Fortgang der Immersionsfixierung für Paraffinschnitte

3.3.5.1 Auswaschung und Dehydration

Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben durch sequentielle Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (siehe Tab. 3.9). Nach 24 h in 70%iger Ethanol-Lösung wurden die Ovarien unter einem Lichtmikroskop vom restlichen Fett- und Bindegewebe befreit, anschließend in kleine Gazebeutel verpackt und wieder in ein mit Alkohol gefülltes Gefäß gehängt. Hierauf wurde mit der Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe fortgefahren. Abschließend wurden die Gewebeproben noch für 72 Stunden in Zedernholzöl eingelegt, welches alle 24 Stunden erneuert wurde. Das Zedernholzöl erleichtert die anschließende Durchdringung des Gewebes mit flüssigem Paraffin.

Tab. 3.9: Alkoholreihe zum Auswaschen, Entwässern und Intermedium

Bouin		PFA	
		Ethanol 50 %	30 min
		Ethanol 60 %	30 min
Ethanol 70 %	25 h	Ethanol 70 %	24 h
In Gazebeutel			
		Ethanol 70 %	1 h
Ethanol 80 %	2 h	Ethanol 80 %	1 h

Ethanol 90 %	1 h	Ethanol 90 %	1 h
Ethanol 96 %	1 h	Ethanol 96 %	1 h
Isopropanol 98 %	insgesamt 6 h, alle 2 h erneuert	Isopropanol 98 %	insgesamt 6 h, alle 2 h erneuert
Zedernholzöl	insgesamt 72 h, alle 24 h erneuert	Zedernholzöl	insgesamt 72 h, alle 24 h erneuert

3.3.5.2 Paraffin-Einbettung

Der Fixierung und Entwässerung folgte nun die Einbettung der Ovarien in Paraffin. Hierzu wurde Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 55-58 °C in einem Gefäß erwärmt und die Gazebeutel mit den Ovarien aus dem Zedernholzöl in das nun flüssige Paraffin überführt. Nach Infiltration des Paraffins in das Gewebe, wurden die Ovarien in Metallförmchen mit Paraffin überführt und wie in Abb. 3.3 gezeigt angeordnet. Beim Abkühlen begann sich das Paraffin zu verfestigen und nach Erkalten des Paraffins konnten die fertigen Blöcke aus der Metallform herausgelöst werden.

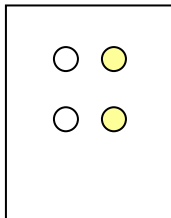


Abb. 3.3: **Anordnung der Ovarien im Paraffin-Block.** In einem Block befanden sich die Ovarien zweier Mäuse, die gleich lange mit männlichen Tieren Kontakt hatten. In einer Zeile nebeneinander befanden sich jeweils die beiden Ovarien einer Maus, wobei das rechte Ovar einer Maus (○) in PFA fixiert war und das linke (●) in Bouin.

Auf diese Weise entstanden insgesamt fünf verschiedene Blöcke.

Block 1: vier Ovarien von zwei Mäusen mit 24 h Kontakt zu männlichen Tieren,

Block 2: vier Ovarien von zwei Mäusen mit 48 h Kontakt zu männlichen Tieren,

Block 3: vier Ovarien von zwei Mäusen mit 72 h Kontakt zu männlichen Tieren,

Block 4: vier Ovarien von zwei Mäusen mit ständigem Kontakt zu männlichen Tieren,

Block 5: zwei Ovarien von einer trächtigen Maus mit ständigem Kontakt zu männlichen Tieren.

3.3.6 Fortgang der Immersions- und Perfusionsfixierung für Kryoschnitte

Die perfusionsfixierten Ovarien wurden wie die immersionsfixierten Ovarien (Kap. 3.3.4) noch für 24 h in 4%ige PFA-Fixierlösung gegeben. Anschließend wurden die Ovarien in Lösungen mit aufsteigenden Sucrosekonzentrationen (Tab. 3.10) inkubiert, um Artefakte durch das anschließende Einfrieren der Gewebe zu vermindern. Dies erfolgte erneut in 2 ml Reaktionsgefäßen, die nach folgendem Schema mit frischer Sucrose-Lösung befüllt wurden:

Tab. 3.10: Sucrose-Lösungen

Sucrose-Lösung (Ansatz)	Zeit
10 % (5 g Saccharose ad 50 ml Aqua dest.)	4 x 15 min
20 % (10 g Saccharose ad 50 ml Aqua dest.)	4 x 15 min
25 % (12,5 g Saccharose ad 50 ml Aqua dest.)	4 x 30 min

Nach der Inkubation in 25%iger Sucrose-Lösung wurden die Ovarien schockgefroren. Hierzu wurde ein 5 cm x 5 cm großes Metallschälchen auf Trockeneis platziert und mit Isopentan befüllt. Bei einer Temperatur von -30 °C wurden die Ovarien einzeln für 5 sec in das flüssige Isopentan gegeben und anschließend sofort in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und dann bei -80 °C gelagert.

3.3.7 Herstellung von Gewebeschnitten

3.3.7.1 Beschichten der Objektträger

Um eine bessere Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu erreichen, wurden diese beschichtet bevor die Schnitte aufgebracht wurden. Zur Beschichtung wurden die Objektträger kurz mit Chromalaun-Gelatine (Tab. 3.11) bedeckt.

Tab. 3.11: Chromalaun-Gelatine

Inhaltsstoffe	Menge
Gelatine	1,0 g
Kaliumchrom(III)-sulfat	0,1 g
Aqua dest.	ad 200 ml (getrennt lösen, bei 40 °C)

3.3.7.2 Paraffinschnitte

Zuerst wurden die Paraffinblöcke kurz in einem Kühlschrank gekühlt. Anschließend wurden sie in ein Schlittenmikrotom der Firma Jung, Heidelberg eingespannt. Nun konnten 3-6 µm dicke Schnitte angefertigt werden. Diese wurden mit einem Pinsel vorsichtig übernommen und in einem Wasserbad aufgefangen und gestreckt. Anschließend wurden die Paraffinschnitte auf Objektträger aufgezogen. Die Trocknung erfolgte über Nacht in einem Wärmeschrank bei 45 °C. Anschließend wurden die Objektträger bei Raumtemperatur in Präparatekästen bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.7.3 Kryoschnitte

Das zu schneidende Ovar wurde in den auf -20 °C abgekühlten Kryostat gelegt. Anschließend wurde es mit einem großen Tropfen Tissue Tek auf dem vorgesehenen Gewebehalter fixiert. Zur Übersicht wurden zuerst 20 µm dicke Schnitte angefertigt. Danach wurde mit einer Schichtdicke von 14 µm weiter gearbeitet. Die Schnitte wurden direkt auf, mit Chromalaun-Gelatine beschichtete, Objektträger aufgedrückt und im -20 °C kalten Kryostat in Küvetten luftgetrocknet. Nach Beendigung des Schneidevorgangs wurden die fertigen Schnitte unmittelbar weiter verarbeitet.

3.4 Histologische Färbungen

3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung)

Für eine orientierende Übersicht wurden zunächst H.E.-Färbungen der unterschiedlichen Paraffinschnitte angefertigt. Für die H.E.-Färbung mussten die Schnitte wieder durch eine Inkubation in Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert werden. Danach wurden sie mit

Hämalaun und anschließend mit Eosin gefärbt und nach erneuter Dehydrierung eingedeckt. Das Färbeprotokoll ist in Tab. 3.12 zusammengefasst.

Tab. 3.12: H.E.-Färbung

Schritte	Zeit
Beschriften der Objektträger	
Xylol	insgesamt 15 min, alle 5 min erneuert
Isopropanol	insgesamt 6 min, alle 2 min erneuert
Ethanol 96 %	insgesamt 4 min, alle 2 min erneuert
Ethanol 90 %	2 min
Ethanol 80 %	2 min
Ethanol 50 %	2 min
Aqua dest.	insgesamt 4 min, alle 2 min erneuert
saures Hämalaun	10 min
bläuen in fließendem Leitungswasser	10 min
Aqua dest.	insgesamt 4 min, alle 2 min erneuert
Eosin	3 min
Ethanol 96 %	10 sec
Ethanol 100 %	10 sec
Isopropanol	insgesamt 9 min, alle 3 min erneuert
Xylol	insgesamt 15 min, alle 5 min erneuert
Eindecken in Corbit	

3.5 Immunfluoreszenzmarkierung peroxisomaler Proteine

3.5.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum spezifischen Nachweis und zur Lokalisation von Peroxisomen wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Hierbei werden Antigene, in unserem Fall peroxisomale Antigene, durch spezifisch bindende und fluoreszierende Antikörper (Ak) visualisiert. Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden entsprechende Antigene zuerst durch einen spezifisch bindenden Primärantikörper detektiert. Ein zweiter, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Antikörper (Sekundärantikörper), bindet anschließend an den F_c-Teil des Primärantikörpers. Nach Anregung bei entsprechender Wellenlänge emittiert der Sekundärantikörper spezifische Lichtsignale. Diese können als indirekter Nachweis der Antigen-Antikörper-Bindung mit einem geeigneten Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

Für eine vergleichende Analyse der Fluoreszenzverteilung und Intensität im Ovar wurden nicht nur C57BL/6-Wildtyp Mäuse sondern auch GFP-PTS1-transgene Mäuse (Kap. 3.1.2) verwendet. Die Peroxisomen dieser Tiere fluoreszieren nach Anregung grün, ohne dass eine vorherige Markierung nötig ist.

3.5.2 Primärantikörper

Es wurden verschiedene Antikörper gegen murine peroxisomale Matrixproteine und Proteine der peroxisomalen Biogenese eingesetzt. Im Folgenden verwendete Primärantikörper waren aus Kaninchen isoliert (Tab. 3.13):

Tab. 3.13: Primärantikörper

Ak / Antigen	Funktion des Antigens	Herkunft
<u>α - Pmp70</u> 70 kDa peroxisomales Membranprotein (Abcd3)	ABC-Transporter für Fettsäurenderivate, Markerprotein für peroxisomale Membranen	A. Völkl, Heidelberg

<u>α - Cat</u> Katalase	ROS Metabolismus, Degradation von H ₂ O ₂ , Markerprotein für peroxisomale Matrix	A. Völkl, Heidelberg
<u>α - Pex14</u> peroxisomaler Biogenese Faktor 14	Integrales peroxisomales Membranprotein, an der Anlagerung für Matrixproteinimport beteiligt	Denis I. Crane, Brisbane (Australia)
<u>α - Aox</u> Acyl-CoA Oxidase 1	Erstes Enzym der peroxisomalen β-Oxidation Weg 1, markiert alle Untereinheiten	A. Völkl, Heidelberg
<u>α - PT</u> Thiolase	Drittes Enzym der peroxisomalen β-Oxidation Weg 1	A. Völkl, Heidelberg

3.5.3 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper diente ein Cy3 Fluoreszenz-markiertes Ziege-Anti-Kaninchen-IgG (goat-anti-rabbit-Cy3, Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK). Der Sekundärantikörper wurde so verwendet, dass die Hintergrundfärbung minimal war, aber die Leuchtintensität der Peroxisomen eine gute Auswertung zuließ. Hierzu wurde der Sekundärantikörper in PBS (Tab. 3.7) verdünnt.

3.5.3.1 DAPI-Färbung

Zur Darstellung von Zellkernen bei der indirekten Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem Sekundärantikörper zusätzlich auch DAPI (4,2-diamino-2-phenylindol) auf die Schnitte aufgetragen. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA, wodurch Zellkerne gefärbt werden.

3.5.4 Markierung in Paraffinschnitten

Die Färbung der Paraffinschnitte erfolgte, etablierende Vorversuche ausgenommen, immer nach einem festen Protokoll. Die Modifizierungen betrafen nur noch die Wahl der unterschiedlichen Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Konzentration. Nachfolgend sind die

Protokolle mit den jeweils am 1. Tag (Tab. 3.14) und am 2. Tag (Tab. 3.16) durchgeführten Arbeitsschritten aufgeführt.

3.5.4.1 Erster Tag

Die Schnitte wurden zur Entparaffinierung in Xylol und danach zur Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe bis ins Aqua dest. inkubiert sowie mit 0,005 % Tween 20 / Triton-X-100 in PBS (Tab. 3.15) gespült, um die Permeabilisation der Schnitte für die Antikörper zu verbessern. Anschließend wurden die Schnitte mit dem in Rotiblock verdünnten Primärantikörper in einer feuchten Kammer für 24 h bei 4 °C inkubiert.

Tab. 3.14: Erster Tag Immunfluoreszenzmarkierung Paraffin

Schritte	Zeit
Beschriften der Objektträger	
Xylol	insgesamt 30 min, alle 10 min erneuert
Isopropanol	insgesamt 6 min, alle 2 min erneuert
Ethanol 96 %	insgesamt 4 min, alle 2 min erneuert
Ethanol 90 %	2 min
Ethanol 80 %	2 min
Ethanol 50 %	2 min
Aqua dest.	5 min
PBS mit Tween 20 / Triton-X-100	insgesamt 15 min, alle 5 min erneuert
Abklopfen der Objektträger, Trocknung der Ränder	
Auftragen, in Roti®-Immunoblock verdünnter, spezifischer Primärantikörper 40 µl pro Objektträger	
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank	24 h

Tab. 3.15: 0,005 % Tween 20 / Triton-X-100 in PBS

Inhaltsstoffe	Menge
PBS	100 ml
Tween 20 / Triton-X-100 (10 %)	50 µl

3.5.4.2 Zweiter Tag

Am zweiten Tag wurden die Schnitte in PBS gewaschen, um den Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte in einer Mischung aus dem verdünnten Sekundärantikörper mit DAPI in einer geschlossenen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Abklopfen und Trocknung der Ränder folgte das Auftragen von Propyl-Galat und das Eindecken mit einem 10 mm x 10 mm großen Deckglas.

Tab. 3.16: Zweiter Tag Immunfluoreszenzmarkierung

Schritte	Zeit
Abklopfen der Objektträger	
PBS	insgesamt 15 min, alle 5 min erneuert
Abklopfen der Objektträger, Trocknung der Ränder	
Auftragen des spezifischen Sekundärantikörper mit DAPI 30 µl pro Objektträger	
Inkubation geschlossene Kammer bei Raumtemperatur, dunkel	1 h
Abklopfen der Objektträger	
PBS	insgesamt 15 min, alle 5 min erneuert
Abklopfen der Objektträger, Trocknung der Ränder	
Eindecken in 11 µl Propyl-Galat pro Objektträger	

3.5.5 Markierung in Kryoschnitten

3.5.5.1 Erster Tag

Die Schnitte wurden unmittelbar vor der Färbung frisch angefertigt und dann vorsichtig in PBS gespült. Anschließend wurden sie mit dem Primärantikörper in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Tab. 3.17: Erster Tag Immunfluoreszenzmarkierung Kryoschnitte

Schritte	Zeit
PBS mit Tween 20 / Triton-X-100	5 min
Abklopfen der Objektträger, Trocknung der Ränder	
Auftragen, in Roti®-Immunoblock verdünnter, spezifischer Primärantikörper 40 µl pro Objektträger	
Inkubation in einer feuchten Kammer bei 4 °C im Kühlschrank	24 h

3.5.5.2 Zweiter Tag

Die am zweiten Tag durchgeführten Arbeitsschritte sind denen der Paraffinschnitte identisch (Kap. 3.5.4.2, Tab. 3.16).

3.5.6 Kontrollen der Immunfluoreszenzmarkierung

Verschiedene Kontrollen sind erforderlich, um die Aussagekraft immunhistologischer Befunde zu erhärten. Die Spezifität der durchgeführten Färbungen wurde durch Positiv- und Negativkontrollen geprüft. Als Positivkontrolle wurde der Antikörper mit Schnitten von Organen (Leber) inkubiert, in denen das Antigen schon mit Sicherheit nachgewiesen worden war. Als Negativkontrolle wurde jeweils statt des Primär- oder Sekundärantikörpers nur die entsprechende Menge an PBS aufgetragen.

3.5.7 Fotodokumentation

Die Dokumentation der Präparate erfolgte mit einer Digital Camera DXM 1200F, Nikon und mit dem zugehörigen Camera Control Programm ACT-1 Version 2.51. Alle Bilder wurden digital gespeichert.

3.5.8 Elektronenmikroskopie

Die Ovarien von GFP-PTS1-transgenen Mäusen wurden durch Perfusion entweder mit Fixans 1 (Tab. 3.18) oder mit Fixans 2 (Tab. 3.19) fixiert. Anschließend wurden die Ovarien zerkleinert und über Nacht im gleichen Fixans inkubiert. Ovarienfragmente, die mit Fixans 1 behandelt waren, wurden weiter in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (50 %, 70 %, 90 %, 96 % und 100 %) und anschließend bei 4 °C in Unicryl inkubiert. Das Unicryl wurde zweimal gewechselt bevor die Fragmente in Gelatinekapseln mit Unicryl überführt wurden. Die Polymerisation des Unicryl erfolgte bei 4 °C unter UV Bestrahlung über mehrere Tage. Einige der Ovarienfragmente, die mit Fixans 2 behandelt waren, wurden mit 2 % OsO₄ für 30 min inkubiert. Osmierte und nicht osmierte Fragmente wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und anschließend in Epon 812 inkubiert. Die Epon-gesättigten Fragmente wurden in Gelatinekapseln mit Epon überführt und im Wärmeschrank bei 60 °C polymerisiert.

Ultradünnschnitte wurden mit einem Reichert Ultracut Mikrotom geschnitten und auf Polyvinyl-beschichtete Nickelnetze aufgenommen. Für Immunfärbungen wurden die Schnitte in TTBS (Tab. 3.20) gewaschen und dann mit einem polyklonalen Antikörper gegen GFP (Rockland, Gilbertsville, USA) in TTBS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen in TTBS wurden die Schnitte mit einem Gold-markierten Sekundärantikörper (10 nm gold, BBIInternational, Cardiff, UK) inkubiert. Die Schnitte wurden schließlich mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Proben wurden mit einem Zeiss EM10 Elektronenmikroskop analysiert. Die Bilder wurden auf Negativfilm aufgenommen und später für die weitere Bearbeitung digitalisiert.

Tab. 3.18: Elektronenmikroskopie Fixans 1

Reagenzien	Menge
Paraformaldehyd	4 %
Glutaraldehyd	0,05 %
HEPES	0,1 M, pH 7,4
Sucrose	2 %

Tab. 3.19: Elektronenmikroskopie Fixans 2

Reagenzien	Menge
Paraformaldehyd	1,25 %
Glutaraldehyd	2,5 %
Picrinsäure	0,05 %
Cacodylatpuffer	0,1 M, pH 7,4

Tab. 3.20: TTBS-Puffer

Reagenzien	Menge
Tris	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,1 %
BSA	0,1 %
NaN ₃	20 mM, pH 8,2

3.5.9 Bildbearbeitung

Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0. Bei allen Fluoreszenzbildern erfolgte eine Tonwertkorrektur der Rot-, Blau- und Grünkanäle. Das heißt, dass bei einem roten Fluoreszenzsignal alle blauen und grünen Pixelfehler herausgerechnet wurden, bei einem blauen Fluoreszenzsignal entsprechend alle roten und grünen. Eine Farbintensitätskorrektur erfolgte gegebenenfalls, um eine möglichst realistische Wiedergabe des visuellen Eindrucks am Mikroskop zu erzeugen, wenn Farbintensitäten nicht für die Bildanalyse wichtig waren. Bei den Bildern ohne Fluoreszenzsignal gilt gleiches auch für die Kontrast- und Helligkeitskorrektur. Der hauptsächliche Grund der digitalen Bildbearbeitung ergab sich jedoch aus der Möglichkeit der digitalen Bildüberlagerung. Hierzu wurden zuvor Bilder einer identischen Stelle auf einem Objektträger mit mehreren unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern angefertigt. Die separaten Bilder konnten so später miteinander verrechnet werden. Hierdurch bestand erstens die Möglichkeit die blau fluoreszierenden Zellkerne (DAPI) direkt in die Fluoreszenzbilder zu integrieren, und zweitens war die Analyse der Kolo-kalisation von Ak (rot fluoreszierend) und GFP (grün fluoreszierend) möglich. Die digitale

Bildüberlagerung erfolgte durch die Funktion: „Bild“ → „Bildberechnungen“ → „negativ multiplizieren“.

3.6 Isolierung von Oozyten

3.6.1 Präparation der Ovarien

Die Präparation der Ovarien für die Isolation von Oozyten erfolgte identisch der in Kap. 3.3.3 beschriebenen Präparation der Ovarien für die Histologie. Insgesamt wurden für die Oozyten-Isolation Ovarien von 42 C57BL/6 Mäusen entnommen.

3.6.2 Zerkleinerung und Separation des Gewebes

Die entnommenen Ovarien wurden unmittelbar nach Entnahme in eine mit Zell-Dissoziationspuffer gefüllte Zellkulturschale überführt. Gibco Cell Dissociation buffer ist ein Enzym-, sowie Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Puffer, der Chelatbildner und Zellen stabilisierende Zusätze enthält. Hierdurch wird die schonende Dissoziation von Geweben in Einzelzellen ermöglicht. Der Präparation der Ovarien folgte, nach Zugabe von DNase (1 $\mu\text{g/ml}$) und Hyaluronidasepuffer, die gründliche mechanische Zerkleinerung des Gewebes mit einer Mikroschere in einem kleinen Becherglas. Hyaluronidase erhöht die Permeabilität der extrazellulären Matrix (EZM) durch den Abbau von Hyaluronsäure. Nach insgesamt 10 bis 30 minütiger Inkubation unter mikroskopischer Kontrolle folgte in einem 15 ml Zentrifugenrohr anschließend die Sedimentation der Gewebestückchen für zweimal 20 sec. Der Überstand wurde abgenommen und für 6 min bei 61 x g zentrifugiert. Das Sediment aus dem 15 ml Zentrifugenrohr wurde erneut mit Hyaluronidasepuffer versetzt und für 10 min in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte wieder die Abnahme des Überstandes und dessen Zentrifugation bei 61 x g für 6 min. Das Sediment im 15 ml Zentrifugenrohr wurde nochmals mit Hyaluronidasepuffer versetzt und für 10 min in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben. Die Überstände und deren, mit PBS verdünnten, Sedimente wurden in Zellkulturschalen unter dem Mikroskop nach Oozyten abgesucht. Eine Übersicht gibt Abb. 3.4.

3.6.3 Picken der Oozyten

Die Kontrolle der Gewebeseparation und das eigentliche Gewinnen der isolierten Oozyten erfolgte in Zellkulturschalen unter dem Lichtmikroskop (CK 40, Olympus oder Axiovert 135, Zeiss). Die Oozyten wurden bei 40facher bis 200facher Vergrößerung begutachtet. Hierbei wurde insbesondere auf Schäden, wie Risse in der Zona pellucida, und Verunreinigung durch noch anhaftende Granulosazellen geachtet. Gut isolierte Oozyten wurden dann i.d.R. unter 40facher Vergrößerung vorsichtig mit einer P2-Pipetman Pipette (Gilson) aspiriert (Abb. 3.5) und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit PBS überführt.

Im Überstand der ersten Zentrifugation befanden sich kaum Oozyten. Im Sediment der ersten Zentrifugation hingegen befand sich der Hauptteil der separierten Oozyten. Ebenso verhielt es sich bei der zweiten Zentrifugation (Kap. 3.6.2). Die Ausbeute der übrigen Fraktionen war viel geringer und es befanden sich dort eher gerissene Oozyten, die nicht verwertet wurden. In Abb. 3.4 werden die Fraktionen zur Isolierung von Oozyten nochmals schematisch dargestellt.

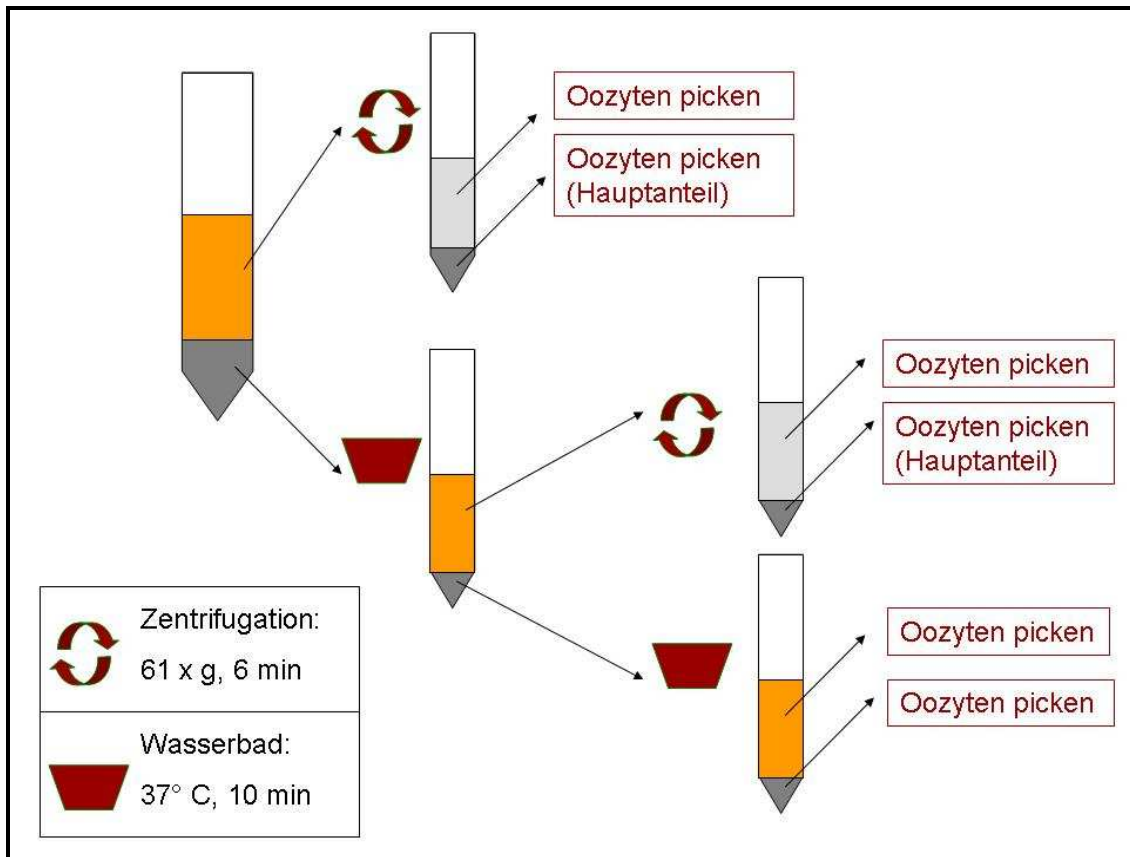


Abb. 3.4: Schema Oozyten-Isolation. Schematisch dargestellt sind 15 ml Zentrifugenrohre mit Sediment und Überstand. Links ist das Rohr nach zweimaliger Sedimentation für 20 sec. Der Überstand wurde abgenommen und in einem neuen Rohr zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand und das mit PBS verdünnte Pellet nach Oozyten abgesucht. Das erste Sediment wurde mit neuem Hyaluronidasepuffer versetzt und im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der zweite Überstand abgenommen, zentrifugiert und Überstand und Pellet nach Oozyten abgesucht. Das übrige Sediment wurde nochmals inkubiert. Orange im Zentrifugenrohr bedeutet, dass nach Abnahme des Überstandes neuer Hyaluronidasepuffer zugegeben wurden.

Nach Beendigung des Sammelvorgangs wurde das 2 ml Reaktionsgefäß mit den Oozyten in einer Eppendorfszentrifuge zweimal für max. 8 sec. anzentrifugiert, wodurch die Oozyten sedimentierten und überschüssiges PBS abgenommen werden konnte. Hierbei wurde ebenfalls unter mikroskopischer Kontrolle gearbeitet, da die gesammelten Oozyten nicht abpipettiert werden sollten. Ebenfalls sollte die Beschädigung dieser, vor Abnahme des Überstandes, durch zu starke Zentrifugation vermieden werden.

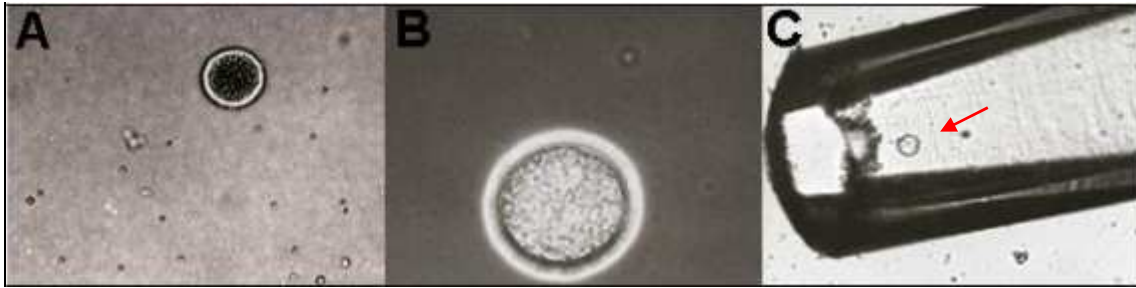


Abb. 3.5: Picken der Oozyten. A) und B) zeigen separierte Oozyten; C) Pipettenspitze mit aspirierter Oozyte (Pfeil).

3.6.4 Zwischenlagerung

Die 2 ml Reaktionsgefäße mit den konzentrierten Oozyten wurden bei -20 °C gelagert, bis alle Oozyten gewonnen waren. Anschließend wurde die RNA-Präparation durchgeführt.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 RNA-Präparation

Zur Isolierung von RNA wurde das RNeasy Midi Kit oder das RNeasy Mini Kit (Quiagen) verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur (20-25 °C) durchgeführt. Zuvor wurde das Gewebe in einem RNase freien Reaktionsgefäß mit RLT-Puffer und mit β -Mercaptoethanol (β -ME) aus dem Kit mit einem IKA T25 digital Ultra-Turrax bei 22000 1/min für 45 sec zerkleinert. Dieser wurde unmittelbar vor dem Gebrauch gründlich in 3 % H_2O_2 und anschließend in Aqua dest. gespült. Anschließend wurde die RNA an eine Säulenmembran gebunden, von der mögliche Verunreinigungen durch mehrere Waschschrte entfernt wurden. Darauf folgte die Elution der RNA in RNase freiem Wasser. Die Isolierung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde mit dem Photometer SmartSpecTM 3000 (Bio-Rad) die Konzentration der eluierten RNA bestimmt und diese bei -20 °C gelagert.

3.7.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription ist eine Methode zur Umschreibung einzelsträngiger RNA in einzelsträngige DNA (cDNA). Hierfür werden Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an die RNA binden. Anschließend werden mittels einer

Reversen Transkriptase Desoxyribonukleotide komplementär zur RNA an den Primer angefügt. Die cDNA Synthese erfolgte mit dem RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Nachfolgende Arbeitsschritte (Tab. 3.21) erfolgten auf Eis und nach den Herstellerangaben. Die Inkubationsschritte wurden in einer PCR-Maschine (PCR Express, Hybaid) durchgeführt. Von der Ausgangs-RNA wurde 1 µg RNA in ein 0,2 ml PCR Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde 1 µl random hexamer primer und DEPC-behandeltes Wasser bis zu einem Volumen von 12 µl hinzugefügt. Der random hexamer primer enthält eine Mischung aus Hexameren zufälliger Sequenz. Nach kurzem Mischen und Anzentrifugation für 3 sec folgte der erste Inkubationsschritt bei 25 °C für 5 min. Anschließend wurde wieder auf Eis der Reihe nach 5x Reaktionspuffer, RibolockTM Ribonuclease inhibitor und 10 mM dNTP-Mix zugegeben. Es folgte nach kurzem Mischen und Anzentrifugation für 3 sec der zweite Inkubationsschritt bei 25 °C für 5 min. Hinzufügen von 1 µl RevertAidTM H Minus M-MuLV RT führte zu einem Gesamtvolumen von 20 µl. Es schlossen sich eine abschließende Inkubation bei 25 °C für 10 min und bei 42 °C für 60 min, sowie dann das Abstoppen der Reaktion bei 70 °C für 10 min an. Die Proben wurden auf Eis überführt. Die Lagerung der entstandenen cDNA erfolgte bei -20 °C.

Tab. 3.21: Protokoll cDNA-Synthese

Reagenzien	Menge
RNA (diverse Konzentrationen)	max. 1 µg
random hexamer primer (0,2 µg/µl)	1 µl
DEPC-treated water	ad 12 µl
Inkubation bei 70 °C für 5 min	
5x reaction buffer	4 µl
Ribolock TM Ribonuclease inhibitor (20 U/µl)	1 µl
10 mM dNTP mix	2 µl
Inkubation bei 25 °C für 5 min	
RevertAid TM H Minus M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl
Inkubation bei 25 °C für 10 min und bei 42 °C für 60 min	
Abstoppen bei 70 °C für 10 min	

3.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Prinzip:

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) beruht auf einer Idee von Kary B. Mullis (Mullis and Faloona 1987; Saiki et al. 1988). Hierdurch ist die spezifische exponentielle Amplifikation eines Nukleinsäureabschnitts bestimmter Länge und Sequenz möglich. Voraussetzung hierfür ist eine DNA-Polymerase, die bei Anwesenheit von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) aus einem einzelsträngigen DNA-Abschnitt als Vorlage oder Matrize (Template) in 5' → 3' Richtung einen komplementären zweiten Strang synthetisiert. Als Startermoleküle dienen kurze (ca. 15 bis 30 nt lange) synthetische Oligonukleotide (Primer). Ein erstes hybridisiert dabei parallel mit dem codogenen Strang und ein zweites Oligonukleotid antiparallel mit dem nicht-codogenen DNA-Strang, wodurch das zu amplifizierende Fragment eingegrenzt wird. Durch nacheinander geschaltete DNA-Replikationsschritte entsteht ab dem dritten Zyklus ein doppelsträngiges DNA-Fragment definierter Länge, dessen Enden durch die beiden Primer festgelegt sind. Der Ablauf einer PCR besteht aus der zyklischen Wiederholung bestimmter Arbeitsschritte. Dies sind die Denaturierung der DNA-Stücke bei ca. 95 °C, die Hybridisierung (Annealing) der Oligonukleotide bei ca. 58 °C und die Verlängerung der Polynukleotidkette (Elongation) bei 72 °C. Damit die DNA-Polymerase bei der Denaturierung nicht irreversibel zerstört wird, verwendet man thermostabile DNA-Polymerasen wie die aus *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase. Ein finaler Inkubationsschritt bei 72 °C bewirkt noch eine Vervollständigung der Amplifikate, bevor die Reaktionen beendet werden und das Reaktionsgefäß auf 4 °C abgekühlt wird. Den Ablauf der PCR-Schritte übernimmt ein programmierbarer PCR-Block. Grundprinzip ist, dass die Anzahl der DNA-Fragmente mit nicht definierter Länge bei jedem Zyklus linear um zwei Fragmente steigt, jedoch die Anzahl der Fragmente mit definierter Länge ab dem dritten Zyklus exponentiell anwächst (Abb. 3.6). Dies führt theoretisch schon nach zehn Zyklen zu einem 50fachen Überschuss.

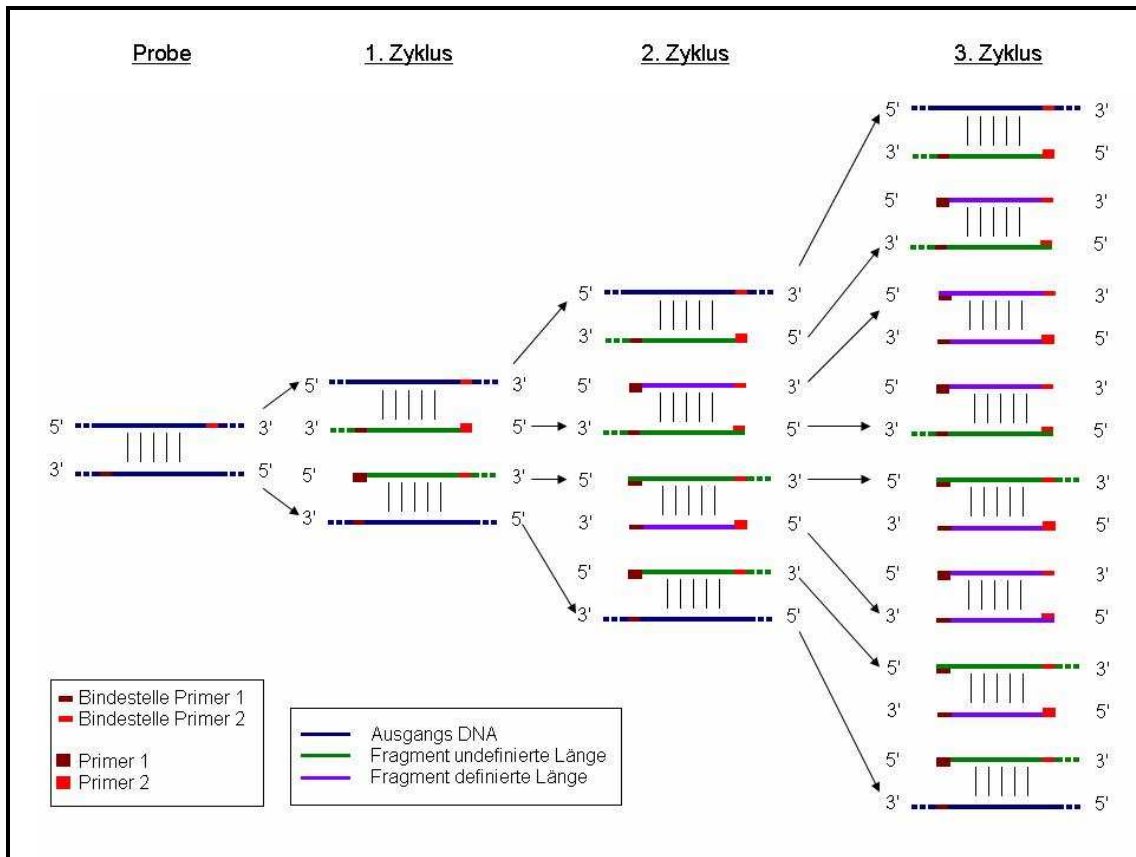


Abb. 3.6: Schema PCR Amplifizierung. Nach Denaturierung lagern die beiden Primer an ihren Bindestellen auf den beiden Elternsträngen (blau) an. Die DNA-Polymerase synthetisiert die 1. Generation von Tochtersträngen (grün), deren 5'-Enden vom jeweiligen Primer gebildet und deren 3'-Enden noch offen sind (gepunktet). In der zweiten Amplifikationsrunde können nach Denaturierung und Abkühlung die komplementären Primer an die Elternstränge und auch an die Tochterstränge der 1. Generation anlagern, so dass die DNA-Polymerase alle vier DNA-Einzelstränge als Template nutzen kann. Theoretisch wird so die Gesamtzahl der DNA-Stränge in jedem PCR-Zyklus verdoppelt. Jedoch entstehen erst ab dem 3. Zyklus dsDNA-Fragmente von definierter Länge (lila), die durch die beiden Primer vorgegeben ist.

3.7.3.1 Durchführung

Es wurde das Taq DNA Polymerase Kit von Fermentas verwendet. Die Proben wurden in 200 µl Reaktionsgefäßen auf Eis pipettiert. Ein Reaktionsansatz mit je 50 µl setzte sich wie folgt zusammen (Tab. 3.22). Die Durchführung (Tab. 3.23) erfolgte im PCR-Block PCR Express von Hybaid.

Tab. 3.22: Reaktionsansatz PCR (50 µl)

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
cDNA (Verdünnung 1:10)	1 µl	
Oligonukleotid 1 (5', up, left), (10 pmol/µl)	1 µl	0,2 µM
Oligonukleotid 2 (3', down, right), (10 pmol/µl)	1 µl	0,2 µM
10x Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	5 µl	1x
MgCl ₂	4 µl	2,0 mM
dNTP Mix (je 25 mM)	0,4 µl	je 0,2 mM
Taq DNA Polymerase, (5 U/µl)	0,2 µl (1 U)	
A.a.i.	37,4 µl	

Tab. 3.23: Programm PCR

Funktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	15 sec	35
Primerhybridisierung	58 °C	30 sec	
Polymerisation	72 °C	30 sec	
Inkubation	72 °C	5 min	1
Terminale Temperatur	4 °C		

3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip:

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel beruht auf der negativen Ladung der DNA, welche sich aus ihrem Phosphatanteil ergibt. Diese Methode ermöglicht erstens Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe zu trennen und zweitens die Größe der Fragmente durch eine ebenfalls mitlaufende DNA-Leiter zu schätzen. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern hierbei, durch ein angelegtes elektrisches Feld, im Gel von der Kathode (Minuspole) zur Anode (Pluspol). Dabei bewegen sich kleine Fragmente schneller als große, da sie die Poren des Agarosegels leichter durchdringen können. Die Porengröße des Agarosegels ist dabei entscheidend für die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente und hängt von der Agarosekonzentration ab.

Anschließend können die Banden, durch den im Gel enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr), welcher irreversibel in Nukleinsäuren interkaliert, durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Intensität der Banden ist dabei grob proportional zur DNA-Konzentration.

3.7.4.1 Durchführung

Für die mit ungefähr 100 bp (Tab. 3.30) sehr kleinen DNA Fragmente wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet. Die Agarose wurde in entsprechender Konzentration in 1x TBE-Puffer in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht. Zu der auf 45-50 °C (gut handwarmen) ab gekühlten Agaroselösung wurde unter Schwenken EtBr (Tab. 3.24) gegeben. Die Lösung wurde in eine abgedichtete Gießform aus Plexiglas gegossen. Die zu beladenden Geltaschen wurden durch einen einsetzbaren Kamm ausgespart.

Tab. 3.24: 90 ml 2 % Agarosegel

Reagenzien	Menge
Agarose	1,8 g (2 %)
1x TBE-Puffer	90 ml
EtBr	9 µl (0,1 µl pro 1 ml Gel)

Nach Auspolymerisieren des Gels und Entfernen des Kamms wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gegeben und ca. 1 cm mit 1x TBE (Tab. 3.25) als Laufpuffer überschichtet. Zu den DNA-Proben wurde jeweils 2 µl 6x Ladepuffer (Tab. 3.26) pro 10 µl Probe hinzugefügt und die Taschen beladen. Durch die im Ladepuffer enthaltene Saccharose sanken die Proben in die Taschen des Gels. Zusätzlich wurden noch 3-5 µl einer 100 bp DNA-Leiter in die erste Tasche aufgetragen. Bei einer Spannung von 140 V und einer Stromstärke von 200 mA, wobei die Geltaschen auf der Seite der Kathode liegen müssen, lief die Elektrophorese für ca. 35 min. Die Gelbanden wurden anschließend auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

Tab. 3.25: 5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

Reagenzien	Menge
Tris	54 g
Borsäure	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml, ph 8,0
A.a.i.	ad 1000 ml

Tab. 3.26: 6x Ladepuffer

Reagenzien	Menge
Tris-HCL	10 mM, ph 7,6
Glycerol	60 %
Bromphenolblau	0,03 %
Xylene cyanol FF	0,03 %
EDTA	60 mM

3.7.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion (QPCR)

Das Prinzip:

Die Quantitative Polymerasekettenreaktion (QPCR) oder auch real-time PCR genannt ist eine der besten Möglichkeiten zur quantitativen Analyse der Genexpression. Die Grundprinzipien der Amplifikation entsprechen denen in Kap. 3.7.3 beschriebenen Prinzipien der Amplifikation der PCR. Die Durchführung erfolgt jedoch in einem programmierbaren QPCR-System, welches zusätzlich, durch die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen, die Menge an dsDNA während jedes einzelnen Reaktionszyklus messen kann. Hierzu wird ein Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. SYBR Green I, der an dsDNA binden kann, benötigt. In gebundenem Zustand fluoresziert dieser nach Anregung grün. In gelöstem Zustand hingegen findet kaum eine Emission statt. Nimmt die Menge an dsDNA im Verlauf einer QPCR zu, so nimmt proportional hierzu auch die messbare Fluoreszenz-Emission zu. Die Detektion dieser ermöglicht eine Quantifizierung der Ergebnisse. Ein Problem dieser Methode ist, dass bei der Verwendung von SYBR Green I keine Spezifität hinsichtlich der zu quantifizierenden DNA-Fragmente gegeben ist, da der Farbstoff unspezifisch in dsDNA interkaliert. Folglich verursachen auch Nebenprodukte wie z.B.

Primerdimere einen Fluoreszenzanstieg. Deshalb wurde nach Abschluss der QPCR immer eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die Temperatur schrittweise von 55 °C auf 95 °C erhöht, und ebenfalls nach jeder Erhöhung die Fluoreszenz-Emission gemessen wird. Ist der Schmelzpunkt eines dsDNA-Fragmentes erreicht, kommt es zur Denaturierung der dsDNA und zur Lösung von Sybr Green I, wodurch die Fluoreszenzintensität stark abnimmt. Andere Fragmente als die spezifischen QPCR-Produkte, bewirken zusätzlich mindestens einen zweiten Schmelzpunkt. Dies wird bei einer Schmelzkurvenanalyse sofort sichtbar.

3.7.5.1 Durchführung

Für alle QPCR-Reaktionen wurde der Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix plus ROX Vial (Abgene) verwendet. Für einen 25 µl Reaktionsansatz (Tab. 3.27) wurden zuerst cDNA und A.a.i. in die Vertiefungen einer 96-well-Platte pipettiert und anschließend ein SYBR Green Mastermix (Tab. 3.28) bestehend aus QPCR SYBR® Green Mix, entsprechenden Oligonukleotiden und A.a.i. dazu gegeben. Zusätzlich lief für jedes Primerpaar immer eine Negativkontrolle mit, bei der die cDNA durch A.a.i. ersetzt wurde. Die Arbeit erfolgte bei Raumtemperatur, da im SYBR Green Mix eine Thermo-Start DNA-Polymerase enthalten ist, welche erst bei 95 °C aktiviert werden muss.

Tab. 3.27: Reaktionsansatz QPCR (25 µl)

Reagenzien	Menge
cDNA (Verdünnung 1:10)	2 µl
A.a.i.	4 µl
SYBR Green Mastermix	19 µl

Tab. 3.28: SYBR Green Mastermix (19 µl)

Reagenzien	Menge	Endkonzentration
2x Absolute QPCR Sybr Green Mix	12,5 µl	1x
Oligonukleotid 1 (5', up, left), (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,2 µM
Oligonukleotid 2 (3', down, right), (10 pmol/µl)	0,5 µl	0,2 µM
A.a.i.	5,5 µl	

Nach Pipettieren der Wells wurden die Platten mit Heatseal Folie (Thermo Scientific) verschweißt. Hierzu wurde der Hitzeversiegler ALPS 50V (Thermo Scientific) verwendet. Die Durchführung der QPCR erfolgte dann im QPCR System Mx3000P (Stratagene) mit folgendem Programm (Tab. 3.29):

Tab. 3.29: Programm QPCR

Funktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung DNA-Polymerase	95 °C	15 min	1
Denaturierung	94 °C	15 sec	40-45
Primerhybridisierung	58-59 °C	30 sec	
Polymerisation	72 °C	30 sec	
Schmelzkurve	55-95 °C	30 sec / 1 °C	1

3.7.5.2 Auswertung

Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte entsprechend der relativen $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dabei wurden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder Startkonzentrationen bestimmt, sondern es wurde die Expression eines Zielgens mit der eines ubiquitär vorkommenden und homogen exprimierten (house-keeping) Gens verglichen. Die Vorteile dieser Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen, sowie Fehler bei der Reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das house-keeping Gen betreffen. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den Proben wurde anschließend auf ein Referenzgewebe bezogen. Die Auswertung der durch das Programm MxPro (Stratagene) gelieferten Fluoreszenzdaten wurde mit Excel 2003 (Microsoft) durchgeführt. Berechnet wurde der ΔC_T -Wert, also die Differenz der C_T -Werte (Cycle Threshold) einzelner Gene und der C_T -Werte eines mitgeführten house-keeping Gens, in unserem Fall Gapdh. Zusätzlich wurde der Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM) der durchgeführten Experimente ermittelt.

$$\Delta C_T = C_{T(Gen)} - C_{T(Gapdh)}$$

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{SD (Standartabweichung); n (Anzahl Experimente)}$$

Anschließend wurde die relative Expression der verschiedenen Gene gegen Gapdh, in einem Gewebe im Vergleich zum Referenzgewebe berechnet.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Zielgewebe})} - \Delta C_{T(\text{Referenzgewebe})}$$

$$E = \text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Auch für die relative Expression wurde der SEM bestimmt.

$$SEM_E = \sqrt{[E \times \ln(2)]^2 \times SEM^2}$$

Die Säulen der in den Ergebnissen gezeigten Graphen visualisieren also das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert im angegebenen Referenzgewebe. Eine Säule repräsentiert den Mittelwert +/- Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten (jeweils Triplikate zweier unabhängiger Gewebeproben, Oozyten siehe Kap. 4.4.1). Signifikante Unterschiede gegenüber dem Referenzgewebe sind mit (*) bei $p < 0,05$ (signifikant) und mit (**) bei $p < 0,01$ (hoch signifikant) markiert. Sie wurden mit dem nicht-parametrischen Mann Whitney-Test ermittelt.

3.7.6 Oligonukleotide (Primer)

Folgende Primer wurden für die PCR und QPCR verwendet (Tab. 3.30):

Tab. 3.30: Primer (alphabetisch)

Gen	Primerpaar		Primer-Position	Frag. [bp]
Abcd1 (Aldp)	5'	5'-GCCAGCCTCAACATCAGG-3'	1915 – 1932	72
	3'	5'-ACTCTTGCCACAGCCATTG-3'	1968 – 1986	
Abcd3 (Pmp70)	5'	5'-TGTTTCAGGACTGGATGGATGT-3'	1786 – 1806	72
	3'	5'-TGATAAAACAGTCTTGCCATCG-3'	1836 – 1857	
Acox2	5'	5'-AAGTGGACATGGCAAGAACAG-3'	1991 – 2011	67
	3'	5'-AACAAGATGGCGTCCTTCC-3'	2039 – 2057	
Acox3	5'	5'-CTAGGACCACGAATCCCAAG-3'	43 – 62	107
	3'	5'-AAGCAACGATAACTATGCACAC-3'	128 – 149	

Aox (Acox1)	5'	5'-GCCCAACTGTGACTTCCATT-3'	580 – 599	73
	3'	5'-GCCAGGACTATCGCATGATT-3'	633 – 652	
Cat (a)	5'	5'-CCTTCAAGTTGGTTAATGCAGA-3'	771 – 792	80
	3'	5'-CAAGTTTTTGTATGCCCTGGT-3'	831 – 850	
Cat (b)	5'	5'-ACAGTGCTAATGAAGACAATGTCAC-3'	1413 – 1437	90
	3'	5'-TGTTCTCACACAGGCGTTTC-3'	1483 – 1502	
Dhapat (Gnapat)	5'	5'-GCAGCTTTCGTGAGACTGG-3'	2076 – 2094	74
	3'	5'-GGCCCGTTCACATAATACACA-3'	2129 – 2149	
Dhap-S (Agps)	5'	5'-GTGTATGACATCGCAGCAAAA-3'	1510 – 1530	62
	3'	5'-CCCCTCTGACCGTTATCTTCT-3'	1551 – 1571	
Dnmt1	5'	5'-CAAATAGATCCCCAAGATCCAG-3'	451 – 472	93
	3'	5'-CGGAACTAGGTGAAGTTTCAAAA-3'	520 – 543	
Figla	5'	5'-CTGGAAGAAGCGAAGGTCTC-3'	397 – 416	81
	3'	5'-GGACACATGAGGGTCAGAGG-3'	458 – 477	
Fshr	5'	5'-ACCCTGAGGCCTTCCAGA-3'	398 – 415	69
	3'	5'-AGTGTTTAATGCCTGTGTTGGA-3'	445 – 466	
Gapdh	5'	5'-TGTCCGTCGTGGATCTGAC-3'	763 – 781	75
	3'	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'	818 – 837	
Gpx1	5'	5'-TTTCCCGTGCAATCAGTTC-3'	256 – 274	76
	3'	5'-TCGGACGTACTTGAGGGAAT-3'	312 – 331	
Gsr	5'	5'-AGTTCCTCACGAGAGCCAGA-3'	851 – 870	67
	3'	5'-CAGCTGAAAGAAGCCATCACT-3'	897 – 917	
Gstk1	5'	5'-GCGCATCCTGGAACCTCTTC-3'	102 – 120	78
	3'	5'-TGTTGGTATCTGCATAGGACCTC-3'	157 – 179	
Lhcgr	5'	5'-GATGCACAGTGGCACCTTC-3'	653 – 671	71
	3'	5'-CCTGCAATTTGGTGGGAAGAG-3'	704 – 723	
Mfp2 (Hsd17b4)	5'	5'-AACCCAGACACCTTCAGAGG-3'	1857 – 1876	61
	3'	5'-GCCTATCTCCCCAAACACAA-3'	1898 – 1917	
Oosp1	5'	5'-TGAGTTTGTCTGTGTTATGCAC-3'	366 – 388	108
	3'	5'-TTGCCCTCATATCTTCTGTCC-3'	453 – 473	

Pbe (Mfp1) (Ehhadh)	5'	5'-CCGGTCAATGCCATCAGT-3'	81 – 98	80
	3'	5'-CTAACCGTATGGTCCAAACTAGC-3'	138 – 160	
Pex3	5'	5'-CAGCATGGTAACTCCATAAACAGT-3'	1123 – 1146	76
	3'	5'-GCCCCGTTCACTATGGGAAT-3'	1180 – 1198	
Pex5	5'	5'-CACATCCGCTTCCTATGACA-3'	934 – 953	73
	3'	5'-AAAAGGCTGAGGGTGGTCA-3'	988 – 1006	
Pex7	5'	5'-CCTCACATCCCTGGTTGTTT-3'	570 – 589	64
	3'	5'-TCACATCCCAGATCCTCAGA-3'	614 – 633	
Pex13	5'	5'-CAAACCCTGGGAGTCTCG-3'	118 – 135	136
	3'	5'-GGGCACTCTTGTAAGTGTTGG-3'	233 – 253	
Pex14	5'	5'-CTCACTCCGCAGCCATACA-3'	285 – 303	60
	3'	5'-AGCCAAGGCACCATAATCTC-3'	325 – 344	
Pex16	5'	5'-CCGTTCTATGACCGCTTCTC-3'	931 – 950	69
	3'	5'-AGGGATGTGGTCTGTAAGCAG-3'	979 – 999	
Pex19	5'	5'-GCAGTTCCAGAAGCTCTCAAAG-3'	316 – 337	62
	3'	5'-CTTGCTGAGAACTTGCATCG-3'	358 – 377	
Pxmp2 (Pmp22)	5'	5'-TCTGCTGCTGTTCTTCTTCG-3'	374 – 393	65
	3'	5'-TGGCAACAAAGACACTGACG-3'	419 – 438	
Sod1	5'	5'-CAGGACCTCATTTTAATCCTCAC-3'	298 – 320	76
	3'	5'-CCCAGGTCTCCAACATGC-3'	356 – 373	
Sod2	5'	5'-CCCATTGCAAGGAACAACA-3'	572 – 590	67
	3'	5'-GTAGTAAGCGTGCTCCCACAC-3'	618 – 638	
Star	5'	5'-TTGGGCATACTCAACAACCA-3'	312 – 331	65
	3'	5'-ACTTCGTCCCCGTTCTCC-3'	359 – 376	
Thiolase A	5'	5'-CTCCAGGACGTGAGGCTAAA-3'	438 – 457	68
	3'	5'-CCTGGCTCAAGAACATTGC-3'	487 – 505	
Thiolase B	5'	5'-AGAAGCAGGATGCCTTTGC-3'	687 – 705	89
	3'	5'-CACAGGCACAATCTCAGCAT-3'	756 – 775	
Zp1	5'	5'-CCTAGGCCAAACCAGACTGT-3'	162 – 181	60
	3'	5'-CTCAAACCGGTTCCCAAA-3'	204 – 221	

Zp2	5'	5'-GCCTCAGTGGCAGATTGTC-3'	1677 – 1695	69
	3'	5'-GGGTGGAAAGTAGTGCGGTA-3'	1726 – 1745	

Die Primer sollten möglichst Intron- oder Exongrenzen-überspannend liegen, um bei der PCR ausschließlich cDNA, die komplementär zur mRNA ist, zu amplifizieren. Eventuelle Verunreinigungen durch genomischen DNA würden so zu erheblich größeren Fragmenten führen, die idealerweise auf Grund der PCR Einstellungen dann gar nicht mehr amplifiziert werden könnten oder zumindest erkannt werden. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg synthetisiert. Mit A.a.i. wurden diese auf eine Konzentration von 100 pmol/μl gebracht und weiter auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/μl in A.a.i. verdünnt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Übersicht

Die funktionelle Charakterisierung von Peroxisomen in murinen Oozyten war das Ziel dieser Arbeit. Ein Hauptteil hierfür war der histologische Nachweis von Peroxisomen in Oozyten. Hierzu wurden, nach Entnahme, Fixierung und Aufbereitung der Ovarien (Kap. 3.3) anhand von H.E.-Färbungen (Kap. 3.4.) optimale Bedingungen für die histologische Untersuchung von Stadien der Follikelreifung etabliert. Die Existenz von Peroxisomen, sowie deren Form und Anzahl während der Follikelreifung wurde durch Immunfluoreszenzmarkierung peroxisomaler Proteine (Kap. 3.5) nachgewiesen. Hierbei wurde eine vergleichende Analyse der Muster von Fluoreszenzverteilung und Fluoreszenzintensität durchgeführt. Da jede Gewebefixierung auch zwangsläufig mit einer Veränderung, vor allem der Sekundär- und Tertiärstrukturen von Proteinen, einhergeht, kann die Detektion von Antigenen mit spezifischen Antikörpern unterschiedlich stark beeinflusst werden. Um einen möglichst realistischen Eindruck zu erhalten, wurde das Gewebe mit zwei unterschiedlichen Fixanzen, nämlich 4 % Paraformaldehyd, 0,1 M HEPES, pH 7,4 und Bouin, konserviert. Zudem wurden zwei unterschiedliche Fixierarten, die Immersionsfixierung und die Perfusionsfixierung, verglichen. Es wurden sowohl Paraffinschnitte als auch Kryoschnitte der jeweiligen Gewebeproben angefertigt. Eine zusätzliche Validierung der Ergebnisse der Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte zudem durch die Kolokalisationsanalyse der Immunfluoreszenz-markierten peroxisomalen Proteine mit GFP-markierten Peroxisomen GFP-PTS1-transgener Mäuse (Mm (C57BL/6)-GFP-PTS1, Kap. 3.1.2).

Der nachfolgende Teil dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden zur Analyse der mRNA Expression in Oozyten und anschließend die Charakterisierung der Funktion von oozytären Peroxisomen durch Expressionsanalyse Peroxisomen-bezogener Gene. Hierzu erfolgte eine

Isolation von Oozyten aus Ovarien (Kap. 3.6), um Oozyten-RNA zu gewinnen. Anhand der spezifischen RNA wurde die oozytäre Expression von Markergenen untersucht, welche charakteristisch für peroxisomale Stoffwechselwege und die peroxisomale Biogenese sind. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese aus Oozyten, und aus Leber und Ovar als Vergleichsgewebe, folgte eine PCR zur spezifischen Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten. Es schloss sich deren gelelektrophoretische Auftrennung (Kap. 3.7.4) an. Primärziel war hierbei die Spezifität der Primer zu überprüfen. Anschließend folgte die Bestimmung quantitativer Expressionslevel interessanter Gene mittels Sybr Green basierter real-time PCR (QPCR) (Kap. 3.7.5). Bei der QPCR wurde die relative Expression eines Gens gegen Gapdh in Ovar und Oozyten im Vergleich zur Leber ausgewertet. Diese Untersuchung charakteristischer Proteine, für die verschiedenen Stoffwechselwege von Peroxisomen, erhärtete nicht nur den Nachweis, sondern erlaubte auch die weitere funktionelle Charakterisierung von Peroxisomen in murinen Oozyten.

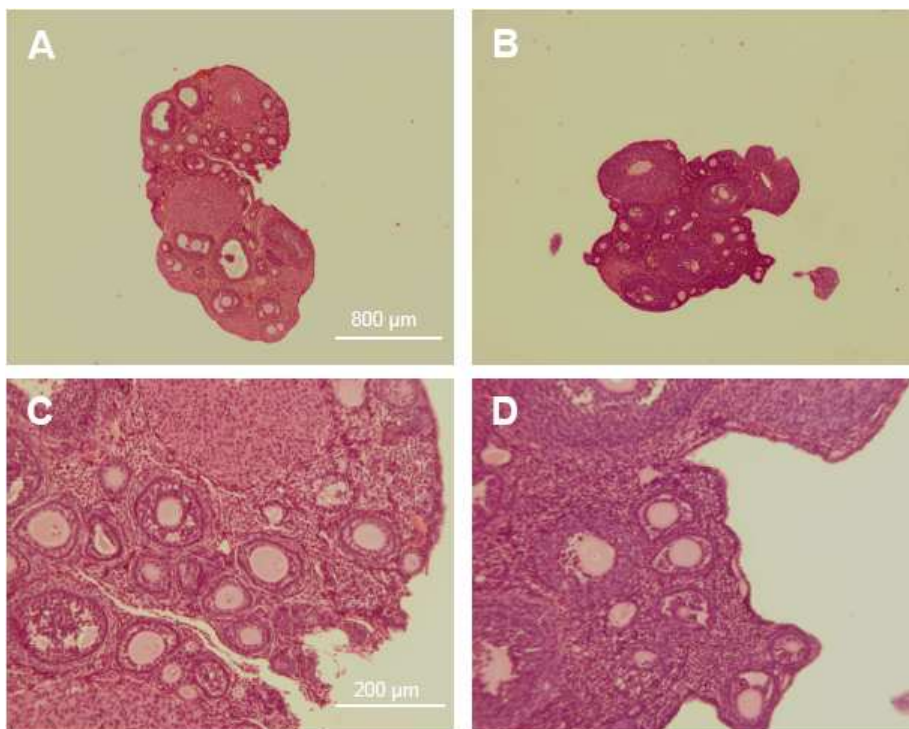
4.2 Etablierung von optimalen Bedingungen für die Untersuchung von Follikeln

Um Expressionsunterschiede von Peroxisomen in den verschiedenen Stadien der murinen Follikelreifung gut untersuchen zu können, sollte das zeitliche Auftreten der einzelnen Follikelstadien näher charakterisiert werden. Die weiblichen Mäuse wurden hierzu für unterschiedlich lange Zeiträume zusammen mit männlichen Tieren gehalten (Kap. 3.1.3) und die Gruppen getrennt betrachtet. Vor allem bei Tieren mit kurzem Kontakt erhoffte man sich das gehäufte Auftreten von frühen Entwicklungsstadien. Es zeigte sich jedoch, dass auch bei den Mäusen, die ständig in Käfigen mit verschiedengeschlechtlichen Tieren gehalten wurden, frühe Stadien der Follikelreifung ausreichend auftraten. Das anfängliche Ziel der Zyklussynchronisation, nämlich das vermehrte Auftreten von frühen Stadien vor allem in den Gruppen mit kurzem Kontakt zu männlichen Tieren beobachten zu können, musste somit nicht weiter verfolgt werden. Im Weiteren wurden die unterschiedlichen Paraffinblöcke deshalb äquivalent benutzt und nicht weiter separiert betrachtet, da Primordial- und

Primärfollikel in den Gruppen mit kurzem Kontakt zu männlichen Tieren zwar etwas häufiger auftraten, aber auch in den Gewebeschnitten der Gruppe mit ständigem Kontakt zu männlichen Tieren ausreichend angeschnitten waren. Daraus folgend wurde auch bei den Ovarien für Kryoschnitte (Kap. 3.3.7.3) im Vorfeld keine Zyklussynchronisation mehr durchgeführt.

4.2.1 Vergleich von Fixierlösungen

Fixierlösungen haben einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis immunhistochemischer Färbungen. Durch ihre Eigenschaften werden die Eiweißstrukturen der Zellen verändert, was die Antigenerkennung beeinflusst. In dieser Arbeit wurden die Gewebeproben für die Paraffin-Einbettung (Kap. 3.3.5.2) mit zwei unterschiedlichen Fixanzien, 4 % Paraformaldehyd, 0,1 M HEPES, pH 7,4 und Bouin, konserviert. Abb. 4.1 zeigt exemplarisch die Gewebeerhaltung an H.E. gefärbten Schnitten. Hierbei wird deutlich, dass die Gewebeerhaltung bei der Bouin-Fixierung (linke Spalte) etwas besser war, aber auch die 4 % PFA-Fixierlösung (rechte Spalte) durchaus zu gut erhaltenen Gewebeschnitten führte.



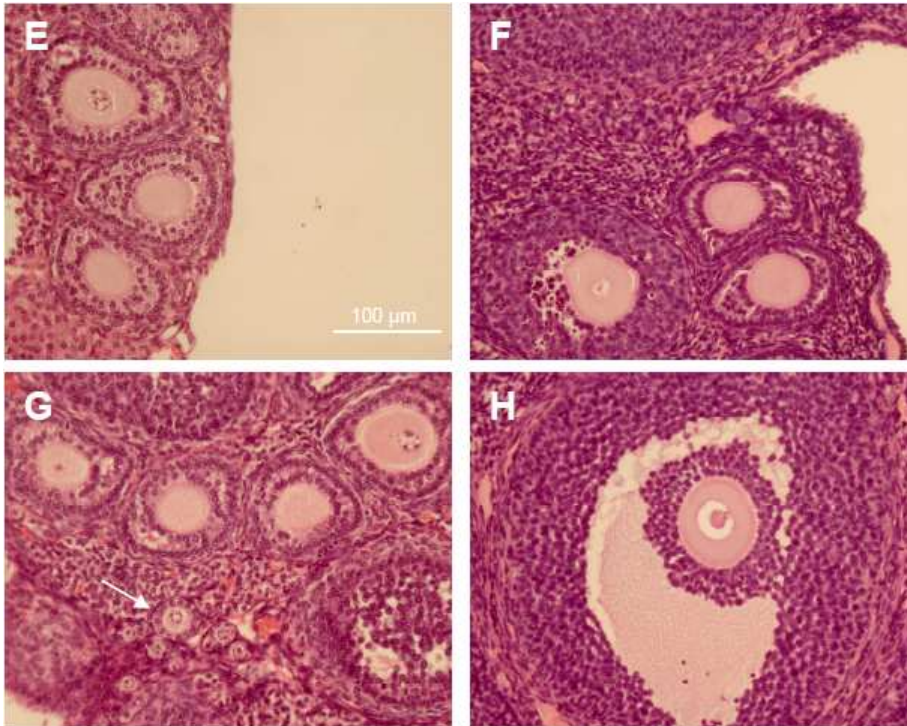


Abb. 4.1: H.E.-Färbungen Ovar. In der linken Spalte (A, C, E, G) sind H.E.-Färbungen von Bouin-fixierten Ovarien gezeigt in der rechten die mit 4 % PFA-Fixierlösung (B, D, F, H). Es zeigt sich bei beiden eine gute Gewebeerhaltung der Oozyten, wobei bei 4 % PFA vereinzelt kleine Gewebeseinrisse sichtbar sind. F) Sekundärfollikel und Tertiärfollikel; G) Sekundärfollikel, Primärfollikel (Pfeil) und darunter einige Primordialfollikel; H) Tertiärfollikel mit Cumulus oophorus. Größenbalken entsprechen den Angaben (in A für A und B und in C für C und D in E für E bis H)

4.3 Analyse der Immunfluoreszenzmarkierung peroxisomaler Proteine in Ovarien der Maus

4.3.1 Optimale Bedingungen und Antikörperverdünnungen

Als optimales Prozedere für die Immunfluoreszenzmarkierung, zeigte sich das in den Methoden beschriebene Vorgehen. Kürzere Inkubationen des Primärantikörpers, vor allem für 1h oder 2h, haben sich nicht bewährt. Auch zwei verschiedene Blockingreagenzien, Roti®-block und Roti®-Immunoblock, wurden getestet. Laut Hersteller bewirken diese eine Erhöhung der Signalstärke bei gleichzeitiger Reduktion von unspezifischen Hintergrundinformationen. Der Unterschied beider Produkte war marginal, jedoch empfanden wir die Ergebnisse mit Roti®-Immunoblock als etwas kontrastreicher, weshalb nur

dieser weiter verwendet wurde. Auch die optimale Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper wurde, durch den Vergleich der Markierungsstärke innerhalb aufsteigender Verdünnungsreihen, etabliert. Die Arbeitskonzentrationen der Primärantikörper α - Pmp70, α - Cat, α - Pex14 und des verwendeten Sekundärantikörpers (goat-anti-rabbit-Cy3) sind in Tab. 4.1 aufgeführt. Bei α - Pex14 ergaben sich bei einer Konzentration von 1/4500 bei Bouin-fixierten Schnitten sehr schöne Ergebnisse, wobei bei PFA-fixierten die Markierung sehr schwach war. Deshalb wurde bei Fotografien mit PFA-Fixierlösung eine Konzentration von 1/1500 verwendet. Für α - Aox und α - PT konnten keine spezifischen Markierungen etabliert werden.

Tab. 4.1: optimale Antikörperkonzentrationen

Antikörper	Paraffin		Kryo
	Bouin	PFA	
α - Pmp70	1 / 500		1 / 500
α - Cat	1 / 500		1 / 500
α - Pex14	1 / 4500	1 / 1500	1 / 1500
α - Aox	nicht möglich		nicht möglich
α - PT	nicht möglich		nicht möglich
goat-anti-rabbit-Cy3	1 / 600		1 / 600

4.3.2 Einfluss von Einbettung und Fixierung auf die Immunhistochemie

4.3.2.1 Paraffineinbettung und Kryokonservierung

Neben der chemischen Fixierung und anschließenden Paraffin-Einbettung besteht auch die Möglichkeit der Gewebekonservierung durch Kälte. Hierdurch ist die Erhaltung der Immunreaktivität der Antigene oft wesentlich effizienter. Nachteilig ist eine schlechtere Gewebeerhaltung, auch aufgrund von Tauvorgängen, bei dieser Methode. Bei den Versuchen dieser Arbeit zeigte sich, dass beide Methoden zu verlässlichen und vergleichbaren Ergebnissen führten. Auffallend war, dass bei den Kryoschnitten die Leuchtkraft der Immunfluoreszenzmarkierungen unter dem Mikroskop stärker war als bei den Paraffinschnitten. Außerdem wirkten die Markierungen sehr viel plastischer. Dies kam aber vor allem auf den angefertigten digitalen Bildern nicht so deutlich

zum Vorschein, da die Fotografien der Kryoschnitte nicht ganz so scharf wirkten wie die der Paraffinschnitte. Ursächlich war eine unterschiedlich starke Überlagerung einzelner Ebenen durch die unterschiedlichen Schnittdicken der Gewebe. Die Kryoschnitte mussten mit 14 µm zwei- bis viermal so dick geschnitten werden wie die Paraffinschnitte mit nur 3-6 µm Dicke. Die Gewebeerhaltung war zwar auch bei den Kryoschnitten noch sehr gut, aber im Vergleich den Paraffinschnitten unterlegen. Zusammenfassend gilt, dass sich die unterschiedlichen Markierungsintensitäten in der Summe nahezu egalisierten, da die bessere Effizienz der Antigenerkennung bei den Kryoschnitten mit einer Unschärfe durch größere Schnittdicken und schlechtere Gewebeerhaltung einhergingen.

4.3.2.2 Perfusionsfixierung und Immersionsfixierung

Die Ovarien wurden auf zwei unterschiedliche Vorgehensweisen fixiert. Neben der Immersionsfixierung, d.h. dass die entnommenen Gewebeproben mit Fixierlösung durchtränkt werden, gibt es auch die Möglichkeit der Perfusionsfixierung. Hierbei werden Organe oder ganze Organismen via Blutgefäße mit Fixierlösung durchspült. Durch die Verkürzung der Zeitspanne zwischen Gewebeentnahme und Fixierung bei der Perfusionsfixierung wird die Gewebeschädigung minimiert, was die Antigenerhaltung weiter verbessert. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten die Gewebeschnitte zwischen den immersionsfixierten und den perfusionsfixierten Ovarien keine signifikanten Unterschiede. Bei beiden Methoden war die Antigenerhaltung sehr gut und die Ergebnisse vergleichbar und reproduzierbar. Das allgemeine Färbemuster einzelner Antikörper unterschied sich bei beiden Methoden nicht. Die gleich guten Ergebnisse beider Methoden lagen möglicherweise daran, dass die murinen Ovarien sehr kleine Organe sind und deshalb auch bei der Immersionsfixierung sehr schnell komplett mit Fixans durchtränkt waren. Tendenziell war die Fluoreszenzintensität der Markierungen nach Perfusion minimal intensiver, was aufgrund unterschiedlicher Schnittebenen und der nie hundertprozentig identischen Gewebeerhaltung nach dem Schneiden und Aufbringen der Kryoschnitte objektiv schwer zu bestätigen war. Ein exemplarischer Vergleich der beiden Methoden ist in Abb. 4.2 gezeigt.

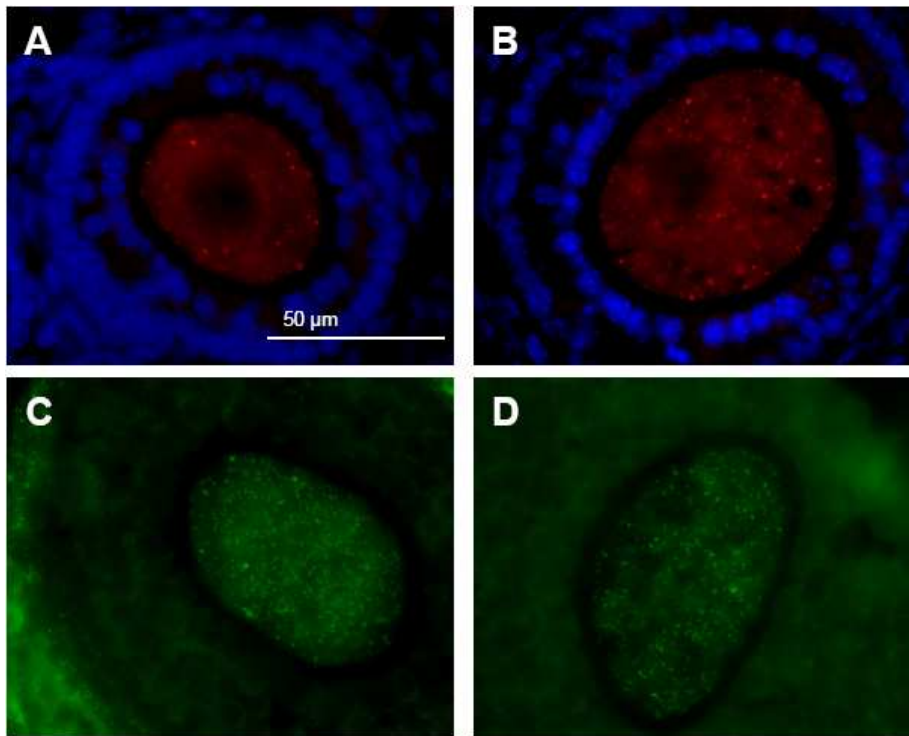


Abb. 4.2: Vergleich Perfusionsfixierung und Immersionsfixierung. Abgebildet sind Kryoschnitte perfusionsfixierter Ovarien (A und C) und immersionsfixierter Ovarien (B und D). Gezeigt ist jeweils ein Sekundärfollikel bzw. Tertiärfollikel mit umliegenden Granulosazellen. A) Oozyte mit α -Pmp70 markierte Peroxisomen mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper und DAPI-Färbung, Perfusionsfixierung, B) Oozyte mit α -Pmp70 markierte Peroxisomen mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper und DAPI-Färbung, Immersionsfixierung; C) GFP Expression markierter Peroxisomen einer GFP-PTS1-transgenen Maus, Perfusionsfixierung; D) GFP Expression markierter Peroxisomen einer GFP-PTS1-transgenen Maus, Immersionsfixierung.

4.3.2.3 Kontrollen der Immunfluoreszenzmarkierung

Wie in Kap. 3.5.6 beschrieben wurden stets Negativkontrollen mitgeführt. Hierbei wurde anstatt der Primärantikörper eine entsprechende Menge PBS aufgetragen. Identisch folgte die Markierung mittels eines goat-anti-rabbit-Cy3 als Sekundärantikörper. In Abb. 4.3 zeigen die Bilder A und B einen Kryoschnitt einer perfusionsfixierten Oozyte einer GFP-PTS1-transgenen Maus. Während eine deutliche GFP-Färbung in Bild A erkennbar ist, ist die Immunfluoreszenzfärbung dieser Oozyte in Bild B deutlich negativ. Beide Bilder wurden zur besseren Übersicht mit DAPI gefärbten Zellkernen überlagert. Die Bilder C, D und E zeigen einen Paraffinschnitt des Ovars einer Bouin-fixierten

C57BL/6 Maus unter verschiedenen Fluoreszenzfiltern. Auch hier wird, besonders mit dem Filter für die Auswertung der Cy3-markierten Immunfluoreszenzen (Bild C) deutlich, dass keine unspezifischen Markierungen vorlagen. Bild F zeigt die Überlagerung DAPI gefärbter Zellkerne mit dem Paraffinschnitt einer in PFA fixierten C57BL/6 Maus. Auch hier ist keine spezifische punktförmige Markierung der Peroxisomen erkennbar.

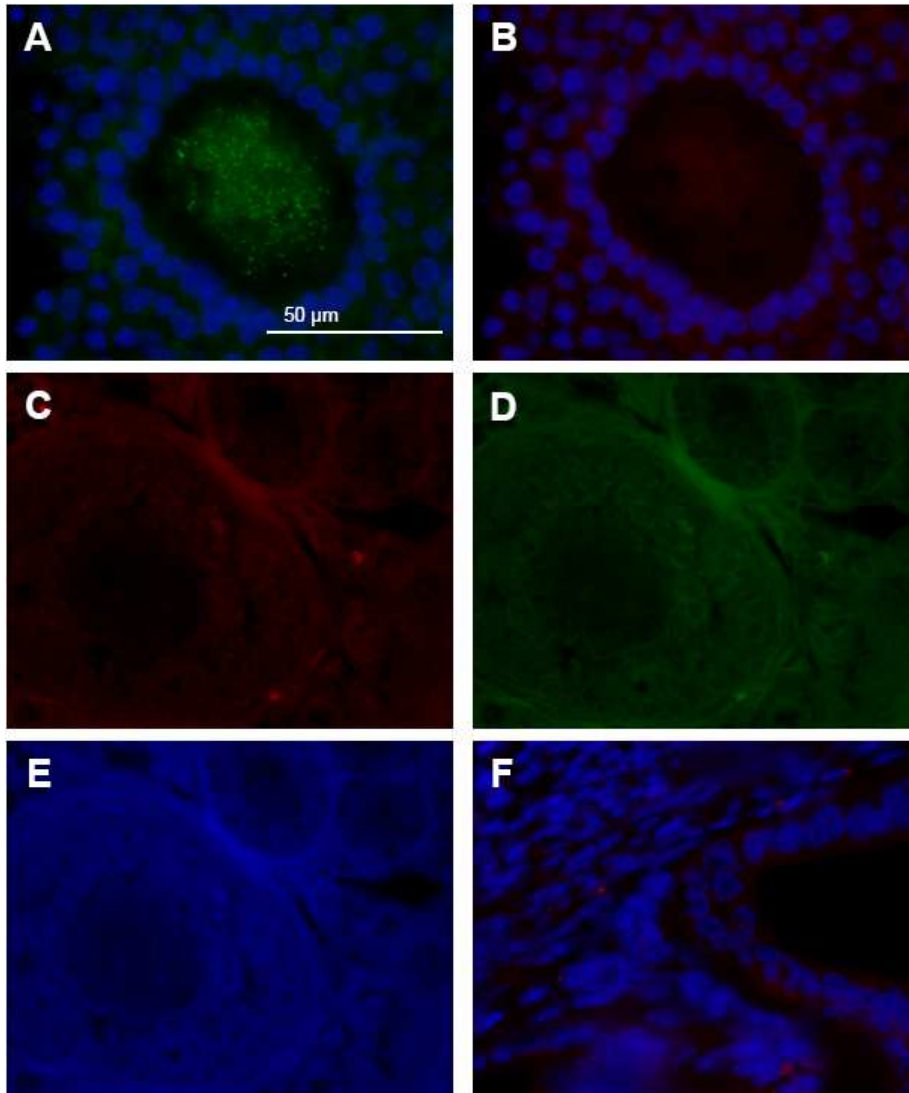


Abb. 4.3: Kontrollen der Immunfluoreszenz. Abgebildet sind Negativkontrollen. Hierbei wurde anstatt des Primärantikörpers nur PBS aufgetragen. Es folgte die Markierung mittels goat-anti-rabbit-Cy3. Bei allen Kontrollen ist keine Fluoreszenzmarkierung sichtbar. A) GFP Expression markierter Peroxisomen einer GFP-PTS1-transgenen Maus und DAPI, Kryoschnitt, Perfusionsfixierung; B) Fluoreszenzmarkierung der identischen Stelle dieses Schnittes und DAPI; C) bis E) Identische Stelle mit verschiedene Fluoreszenzfiltern [C) Cy3-Kanal], Paraffin,

Bouin, Immersionsfixierung; F) Kontrolle Fluoreszenzmarkierung bei PFA-Fixierung, mit DAPI, Paraffin, Immersionsfixierung.

4.3.3 Oozytäre Peroxisomen enthalten Katalase, Abcd3 und Pex14

Der Nachweis von Peroxisomen in Oozyten durch Immunfluoreszenzmarkierung gelang mit den Primärantikörpern α -Pmp70 (Abcd3), α -Cat und α -Pex14. Alle Immunfluoreszenzmarkierungen zeigten ein für Peroxisomen typisches feines punktförmiges Muster. Auffallend war bei allen Antikörpern eine deutliche Markierung in den Oozyten selbst und eine unterschiedlich stark ausgeprägte Markierung in den umliegenden Zellen. Die Fluoreszenzverteilung betraf bei allen Antikörpern die gesamte Oozyte gleichermaßen mit einer deutlichen Aussparung am Zellkern, falls dieser angeschnitten war. Die Markierung mit α -Pex14 erzeugte den intensivsten und stärksten Fluoreszenzeindruck. Dieser war vom Markierungsmuster identisch wie die Markierungen durch α -Pmp70 und α -Cat. Abb. 4.4 zeigt in Bild A und B zwei Paraffinschnitte mit α -Pmp70 markierten Oozyten. Im Vergleich ist das Muster, einer α -Pmp70 markierten Oozyte im Kryoschnitt etwas plumper (Bild C). Die Kryoschnitte mit α -Pex14 markierter Oozyten (Bilder G und H) unterscheiden sich im Färbemuster nicht von den Bildern C (α -Pmp70) und E (α -Cat), sind aber etwas fluoreszenzintensiver. Sichtbar ist auch eine punktförmige Markierung umliegender Granulosazellen. Hier waren die Markierungen bei allen Antikörpern eher fein, wohingegen in Oozyten zum Teil auch schon fast plump und eher schollig wirkende Agglomerate zu beobachten waren. Diese fanden sich genauso auch bei den Kolokalisationsanalysen zwischen Immunfluoreszenzmarkierung mittels Antikörper und den GFP-Signalen transgener Mäuse (Kap. 4.3.5) an entsprechenden Stellen.

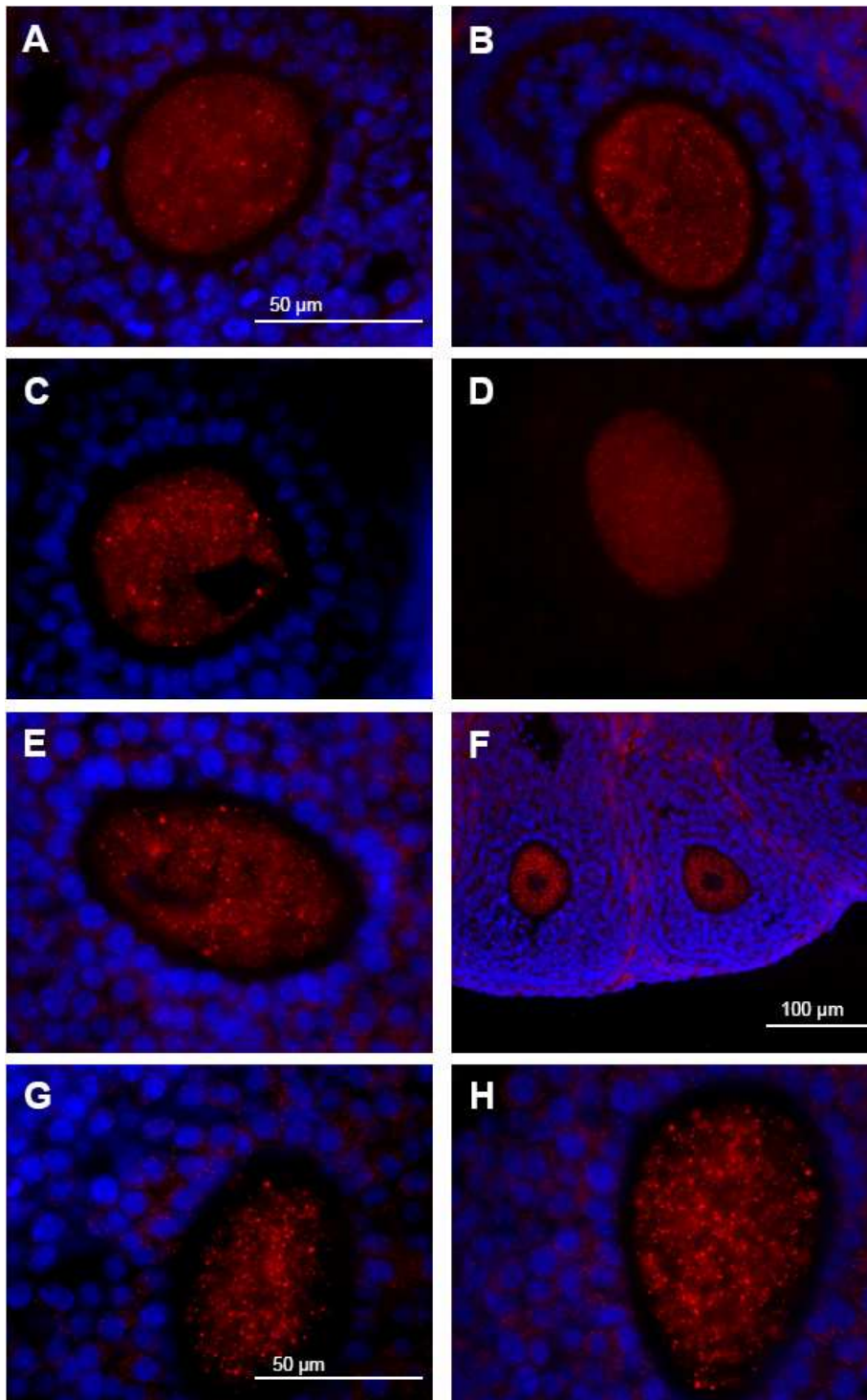


Abb. 4.4: Antikörperabhängiger Nachweis von Peroxisomen. A und B) Oozyte mit α -Pmp70 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Immersion, 4 % PFA, Paraffin; C) Oozyte mit α -Pmp70 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Perfusion, Kryo; D) Oozyte mit α -Cat und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen, Immersion, 4 % PFA, Paraffin; E) Oozyte mit α -Cat und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-

Färbung, Perfusion, Kryo; F) Oozyten mit α -Pex14 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Immersion, 4 % PFA, Paraffin; G) Oocyte mit α -Pex14 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Immersion, Kryo; H) Oocyte mit α -Pex14 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Immersion, Kryo.

4.3.4 Peroxisomen proliferieren im Verlauf der Follikelreifung

Peroxisomen konnten in allen Stadien der Follikelreifung immunhistochemisch gezeigt werden. In Primordialfollikeln zeigten sich noch nur vereinzelte punktförmige Markierungen während mit zunehmender Reifung die Markierungen immer dichter wurden. Die Oozyten in Primärfollikeln waren schon deutlich mit Peroxisomen ausgestattet. Über Sekundär- und schließlich in Tertiärfollikeln wurde die Markierung immer intensiver und die Anzahl der markierten Peroxisomen nahm deutlich zu. Mit Ausnahme der Zellkerne waren die Oozyten gleichmäßig von der Peripherie bis ins Zentrum übersät mit Immunfluoreszenzsignalen. Offensichtlich kam es während der Follikelreifung, welche auch mit einer Volumenzunahme der Oozyten einhergeht, zu einer massiven Proliferation der Peroxisomen. Die Auszählung von jeweils 10 Schnitten der einzelnen Follikelstadien ergab schon eine Verdreifachung der Peroxisomenanzahl vom Primordialfollikel (kleine Oocyte bis 20 μm) zum Primärfollikel (kleine oder schon wachsende Oocyte). Vom Primärfollikel zum Sekundär- bzw. Tertiärfollikel mit großer Oocyte (Oozytendurchmesser 70 μm) kam es nochmals zu einer 12fachen Vermehrung der Anzahl an Peroxisomen. In Abb. 4.5 sind verschiedene Follikelstadien in Paraffin- und Kryoschnitten gezeigt, bei denen die Peroxisomen durch Immunfluoreszenzmarkierung visualisiert wurden.

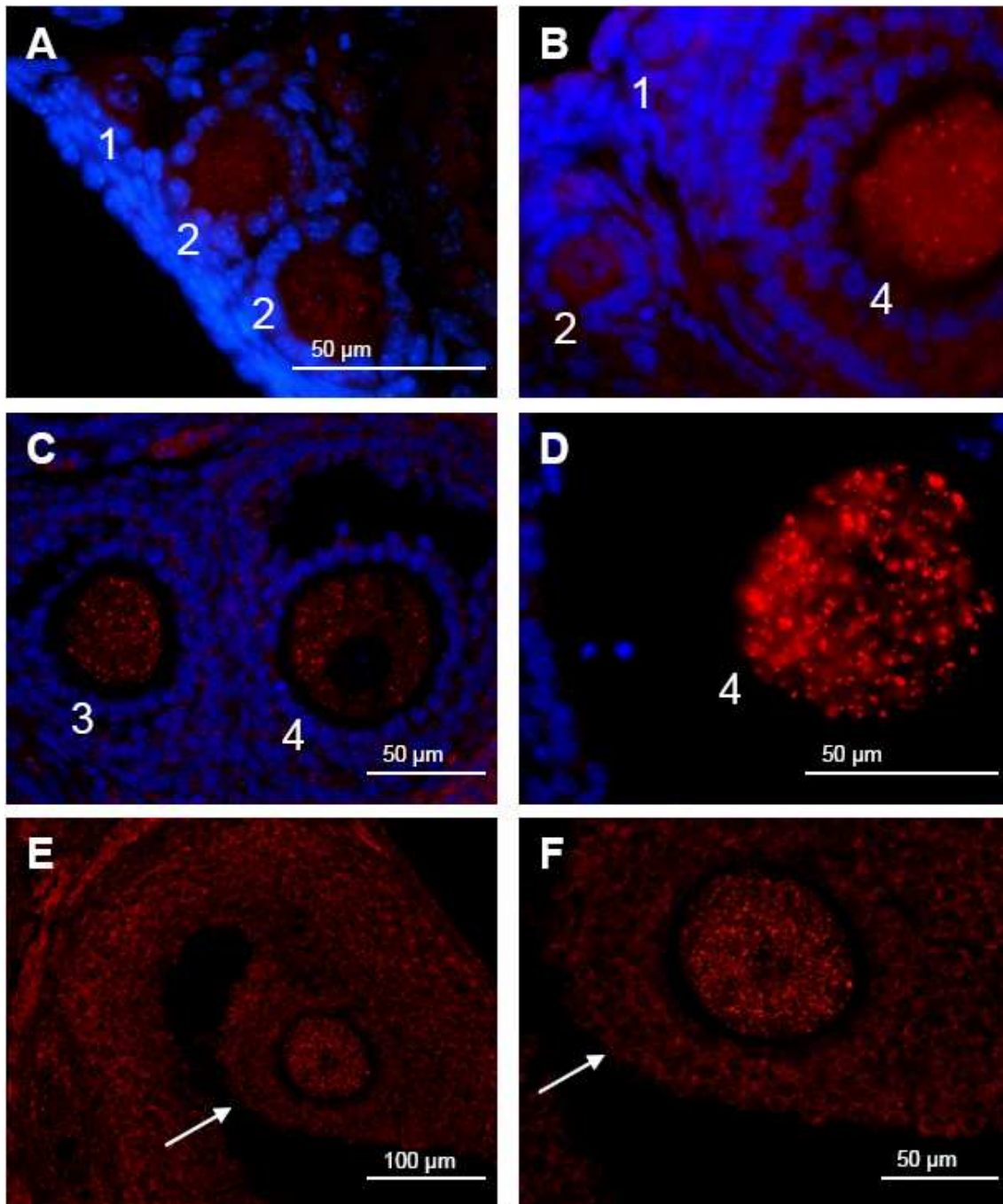


Abb. 4.5: Stadienabhängiger Nachweis von Peroxisomen. Primordialfollikel zeigen eine vereinzelte Markierung (1), die bei Primärfollikeln (2) und Sekundärfollikeln bzw. frühen Tertiärfollikeln (3) deutlich zunimmt. Reifere Tertiärfollikel sind übersät mit Peroxisomen (4). (→) Cumulus oophorus mit Eizelle; A) Oozyten mit α -Pmp70 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Immersion, Kryo; B) Oozyten mit α -Pmp70 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Perfusion, Kryo; C) Oozyten mit α -Pex14 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen und DAPI-Färbung, Immersion, 4 % PFA, Paraffin; D) reifer Tertiärfollikel mit α -Pex14 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten

Peroxisomen und DAPI-Färbung, Immersion, Kryo; E) reifer Tertiärfollikel mit α -Pex14 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen, Immersion, Bouin, Paraffin; F) reifer Tertiärfollikel mit α -Pex14 und Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper markierten Peroxisomen, Immersion, Bouin, Paraffin.

4.3.5 GFP kolokalisiert mit peroxisomalen Markerproteinen in GFP-PTS1-transgenen Mäusen

Zur Analyse der Kolokalisation wurden Bilder einer identischen Stelle auf einem Objektträger durch unterschiedliche Fluoreszenzfilter angefertigt. Diese separaten Bilder wurden später am PC miteinander verrechnet. Fand hierbei eine genaue Kolokalisation einzelner Fluoreszenzsignale der Immunfluoreszenzmarkierung durch einen Antikörper mit der Autofluoreszenz mit GFP-markierter Peroxisomen GFP-PTS1-transgener Mäuse statt, wurden diese als gelbe Farbsignale dargestellt. Abb. 4.6 zeigt solch eine Kolokalisation für die Immunfluoreszenzmarkierung mit dem Primärantikörper α -Cat. Bild A zeigt hierbei die mit DAPI gefärbten Zellkerne zur Orientierung. Bild B zeigt die GFP-Expression und Bild C die Immunfluoreszenzmarkierung mit α -Cat und einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper. Bild D und E zeigen die digitale Überlagerung. Kolokalisationsanalysen wurden stichprobenartig für die Primärantikörper α -Pmp70, α -Cat und α -Pex14 durchgeführt. Für alle verwendeten Primärantikörper konnte eine Überlagerung mit der GFP-Markierung GFP-PTS1-transgener Mäuse gezeigt werden. Hierbei zeigt sich, dass die kleinen „typischen“ Markierungen für Peroxisomen exakt kolokalisiert sind. Zudem sind in den Immunfluoreszenzmarkierungen mehrere „plumpere“ oder elongierte Peroxisomenmuster erkennbar, die teils „schollig“ wirken. In Abb. 4.6 wird deutlich gezeigt, dass auch diese Strukturen eindeutig kolokalisiert werden können und somit der Autofluoreszenz mit GFP-markierter Peroxisomen entsprechen. Wahrscheinlich unterscheidet sich an diesen Stellen die Morphologie der Peroxisomen.

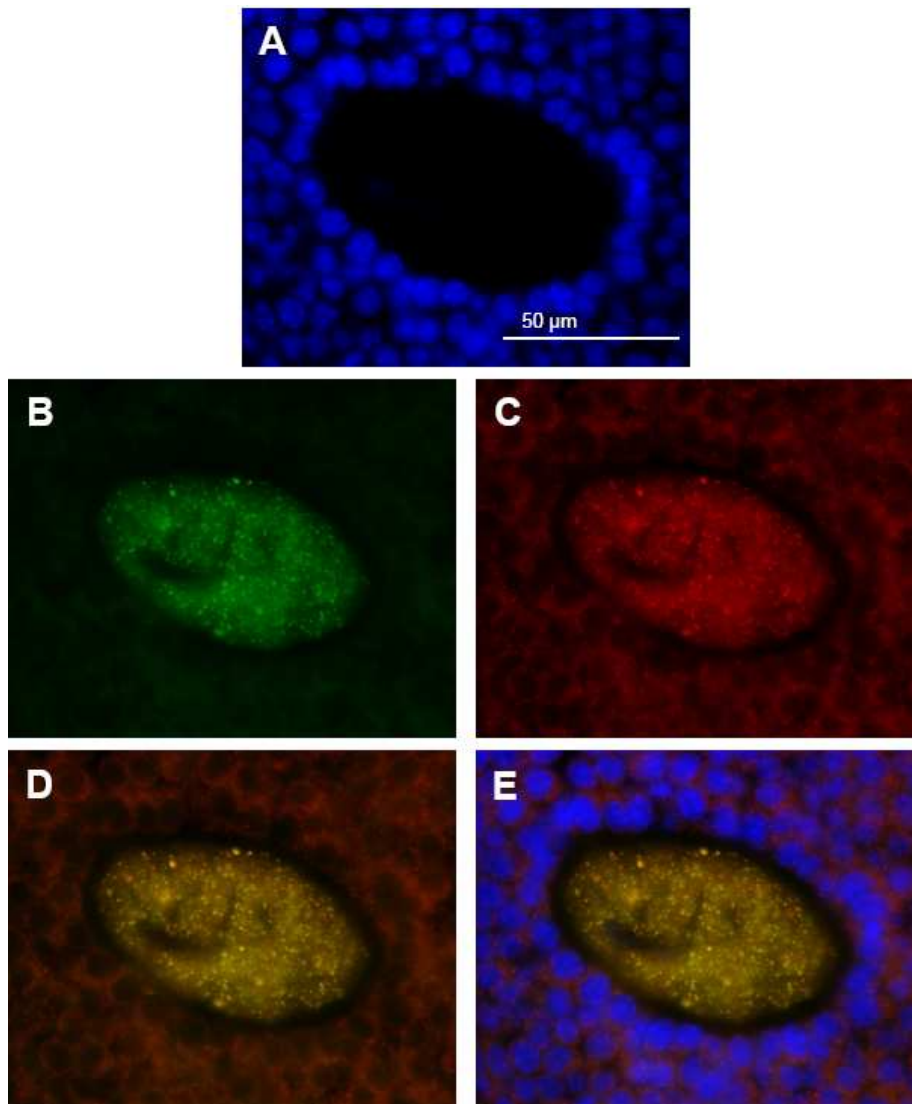


Abb. 4.6: Kolokalisation Ak und GFP. Abgebildet sind Kryoschnitte einer identischen Stelle auf einem Objektträger. Gezeigt ist ein Tertiärfollikel mit umliegenden Granulosazellen aus dem Ovar einer perfusionsfixierten GFP-PTS1-transgenen Maus. A) DAPI-Färbung, sichtbar sind Zellkerne der Granulosazellen, in der Mitte ohne Färbung die Oozyte, deren Kern leicht angeschnitten ist; B) GFP Lokalisation; C) α -Cat markierte Peroxisomen mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper; D) Digitale Bildüberlagerung von B und C, Kolokalisation wird gelb; E) Digitale Bildüberlagerung von D und A.

4.3.6 Elektronenmikroskopische Darstellung GFP-markierter Peroxisomen

Um die Ultrastruktur der Peroxisomen in reifen Oozyten genauer zu untersuchen, wurden Ovarien von GFP-PTS1-transgenen Mäusen elektronenmikroskopisch untersucht. Bei immunoelektronenmikroskopischen

Aufnahmen zeigte sich, dass die GFP-markierten Peroxisomen (siehe Goldkörner in Abb. 4.7 A und B) eine feingranuläre Matrix enthalten, die von einer einfachen Membran umgeben ist. Ein vergleichbares Bild zeigten die Peroxisomen auch in kontrastreichen osmierten Schnitten (Abb. 4.7 C). In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich auch, dass die Peroxisomen nicht gleichmäßig in den Oozyten verteilt waren, sondern in der Peripherie nahe der Zona Pellucida vermehrt vorkamen. Dabei waren sie gelegentlich zu kleineren Gruppen zusammengelagert.

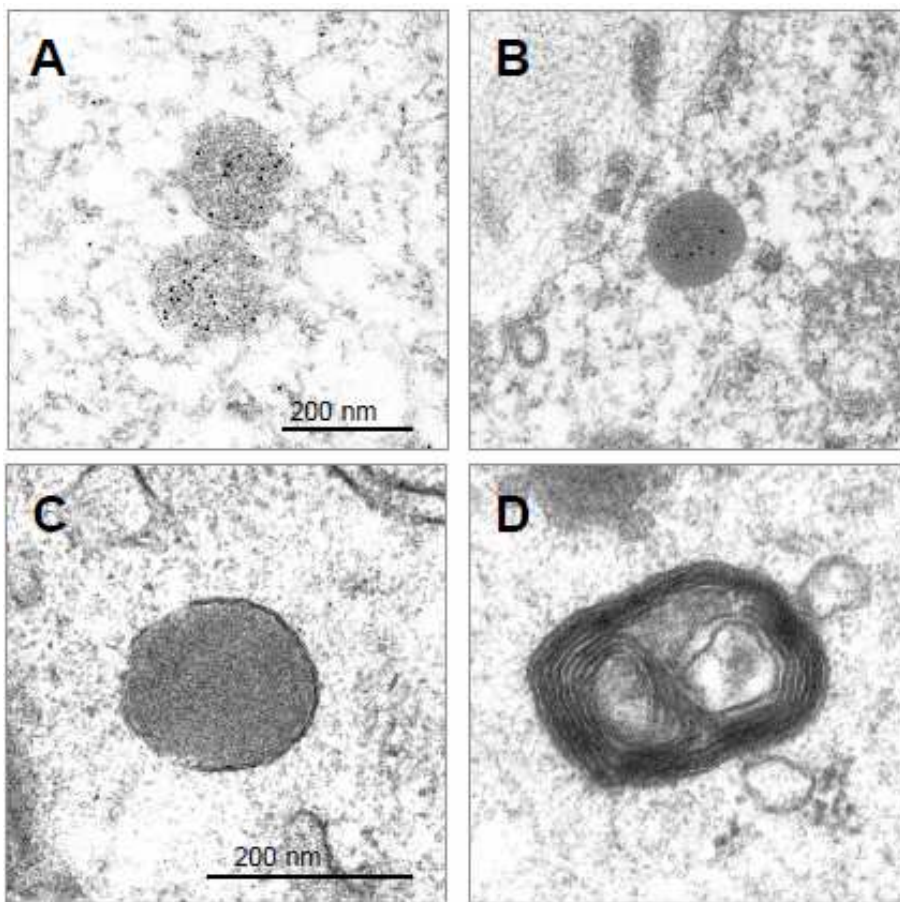


Abb. 4.7: Ultrastruktur von Peroxisomen in reifen Oozyten. Immunelektronenmikroskopische Lokalisation von GFP in Oozyten GFP-PTS1-transgener Mäuse (Goldkörner in A und B). Einbettungen in Unicryl (A) und Epon (B). Konventionelle elektronenmikroskopische Aufnahme von einem Peroxisom (C) und einem multilamellären Körper (D) in osmierten Eponschnitten. Größenbalken entsprechen 200 nm (in A für A und B und in C für C und D).

4.4 Analyse der Oozytären Genexpression durch quantitativen Nachweis von mRNA

Nach den Immunfluoreszenzanalysen wurde anhand spezifischer RNA die oozytäre Expression von Markerproteinen untersucht, welche charakteristisch für peroxisomale Stoffwechselwege und die peroxisomale Biogenese sind. Mit Hilfe einer Sybr Green basierten QPCR erfolgte die Bestimmung quantitativer Expressionslevel repräsentativer Gene. Hierbei wurde, zur Überprüfung der Oozyten-Reinheit, die relative Expression bestimmter Gene gegen Gapdh in Oozyten im Vergleich zum gesamten Ovar ausgewertet. Im Gegensatz dazu wurde zur Bestimmung der Expressionslevel peroxisomaler Gene die relative Expression eines Gens gegen Gapdh in Ovar und Oozyten im Vergleich zur Leber ausgewertet. Hierdurch war eine funktionelle Charakterisierung von Peroxisomen in murinen Oozyten möglich. Aufgrund der geringen Menge an RNA einzelner Oozyten wurden diese wie nachfolgend in Kap. 4.4.1 beschrieben, gepoolt. Der RNA-Präparation und cDNA-Synthese aus Oozyten, und aus Leber und Ovar als Vergleichsgewebe, folgte eine PCR zur spezifischen Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten mit anschließender Analyse der Fragmentgrößen durch Gelelektrophorese. Danach folgte die Analyse der oozytären Genexpression durch quantitativen Nachweis von mRNA mittels QPCR. Primerpaare, die bei der gelelektrophoretischen Auftrennung zwar eine spezifische Bande zeigten aber bei der obligat durchgeführten Schmelzkurvenanalyse der QPCR auffällig waren, wurden nicht weiter berücksichtigt. Als Beispiel ist in Abb. 4.8 die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse für den verwendeten Primer Dhap-S und für den aussortierten Primer Star gezeigt. Dieser weist zusätzlich unspezifische Produkte auf.

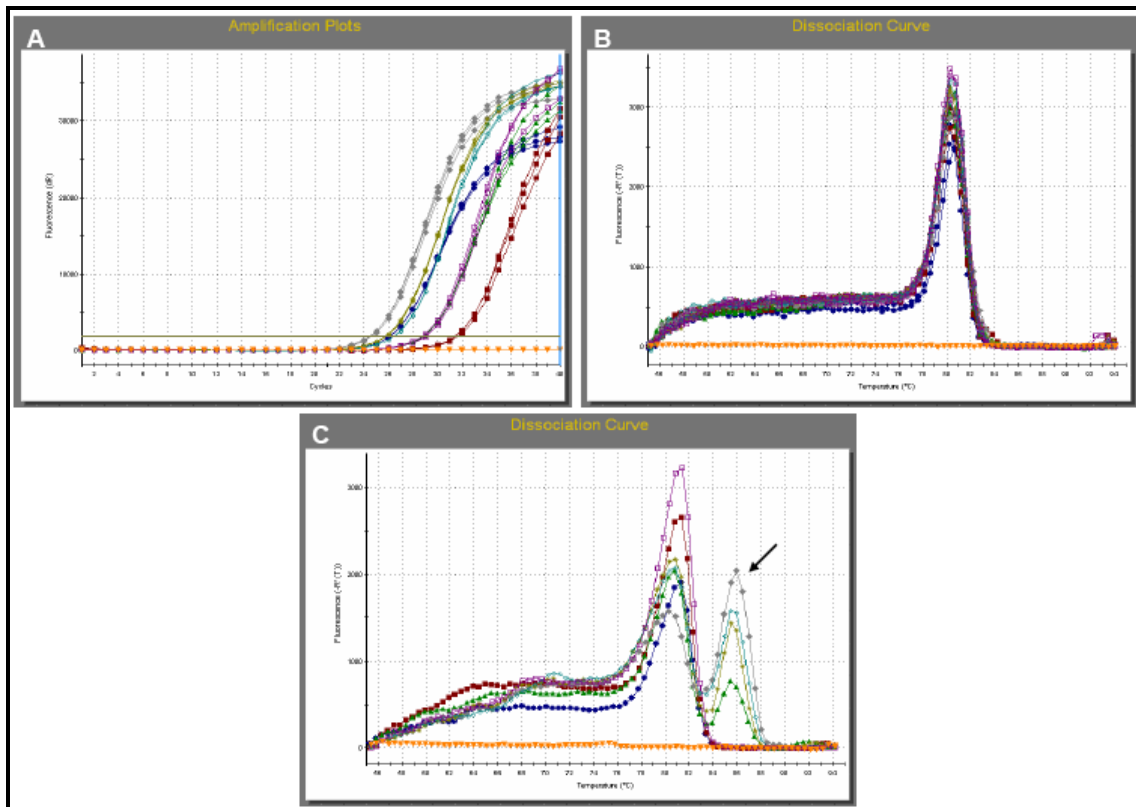


Abb. 4.8: Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse. Der orange Graph ist die Kontrolle ohne cDNA, farbige Graphen entsprechen diversen cDNA Proben. A) zeigt die Amplifikationskurven mit den Primern für das Gen Dhap-S, die graue waagerechte Linie ist der Schwellenwert (Threshold); B) und C) zeigt Schmelzkurven. Hierbei ist $-(\text{erste Ableitung der Fluoreszenz})$ gegen die Temperatur aufgetragen, d.h. ein Peak entspricht einer starken Fluoreszenzabnahme bei entsprechender Temperatur. B) Proben mit den Primern für das Gen Dhap-S, ein Graph hat nur einen spezifischen Peak, die Peaks versch. Graphen (cDNA Proben) überlagern sich; C) Proben mit den Primern für das nicht berücksichtigte Gen Star, hier sind zusätzlich unspezifische Produkte vorhanden (zweiter Peak, siehe Pfeil).

4.4.1 Repräsentative Oozyten-mRNA-Pools

Nach der Isolierung der Oozyten, wurden diese gesammelt und gepoolt. Hierbei wurden zuerst die Oozyten von insgesamt 21 Mäusen gesammelt, dann die RNA-Präparation und die cDNA-Synthese durchgeführt. Nach Etablierung der PCR und QPCR und diversen Reaktionen mit Oozyten-cDNA zur Überprüfung derer Qualität und Reinheit, wurde noch ein vergleichbarer zweiter Pool aus Oozyten hergestellt. In allen Ergebnissen mit Oozyten-cDNA der nachfolgenden QPCR wurde, für jede Reaktion mit einem bestimmten Primerpaar, ein Triplikat

aus dem ersten Pool und ein Triplikat aus dem zweiten Pool pipettiert. Somit repräsentieren die Ergebnisse der Experimente mit Oozyten-cDNA letztendlich gemittelte Werte aus mRNA von 42 verschiedenen Mäusen, also von Oozyten aus 84 Ovarien.

4.4.2 Reinheit der Oozyten-Präparation

Die Qualität der Oozyten Isolation wurde anhand von zwei Kriterien bestimmt. Auf der einen Seite durch die möglichst starke Anreicherung von mRNA Oozyten-spezifischer Gene, und auf der anderen Seite durch einen möglichst geringen Anteil von mRNA, die auf eine Verunreinigung mit anderen Zellen eines Ovars hindeutet. Zur Bestimmung der Oozyten-Anreicherung wurden die in Tab. 4.2 aufgeführten Primer zur Quantifizierung von Oozyten-spezifischen Genen verwendet:

Tab. 4.2: Primer Oozyten-Anreicherung (alphabetisch)

Primer	Protein (mus musculus)	Kommentar
Dnmt1	DNA methyltransferase (cytosine-5)	Schmelzkurve unsauber
Figla	folliculogenesis specific basic helix-loop helix	PCR Bande unspezifisch
Oosp1	oocyte secreted protein 1	ausgewertet
Zp1	zona pellucida glycoprotein 1	ausgewertet
Zp2	zona pellucida glycoprotein 2	Schmelzkurve unsauber

Wie in Kap. 4.4 beschrieben wurde zuerst die Spezifität der Primer getestet. Hierbei zeigte das Fragment der Figla-Primer bei der gelelektrophoretischen Auftrennung kein Fragment der erwarteten Größe, sondern eine unspezifische zu tief laufende Bande (nicht dargestellt) und wurde für die Auswertung und die QPCR nicht weiter berücksichtigt. Im Gegensatz zeigt Abb. 4.9 in Spur 03, 04, 05 und 06 korrekte Banden für die Expression der Gene Dnmt1 (Fragment: 93 bp), Zp2 (69 bp), Zp1 (60 bp) und Oosp1 (108 bp) im Ovar. Zp1 war im Original unter UV-Licht ebenfalls deutlich sichtbar. Bei der Analyse mit oozytärer cDNA waren die Banden für die genannten Gene Dnmt1, Zp2, Zp1 und Oosp1 noch

deutlicher zu sehen, wie die Spuren 09 bis 12 zeigen. Hier zeigt auch Zp1 eine eindeutige Bande.

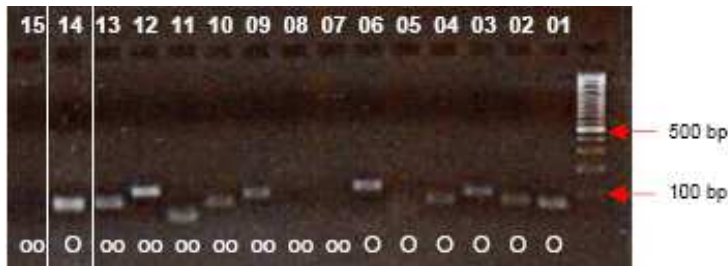


Abb. 4.9: Gelbild zum Nachweis Oozyten-spezifischer und nicht oozytärer Gene.

Gezeigt ist ein mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbtes Agarosegel. An der DNA-Leiter sind die 100 bp und die 500 bp Marke gekennzeichnet. Oben im Bild sind die Spuren nummeriert und unten die Template cDNA gekennzeichnet: (O) bedeutet Ovar und (oo) bedeutet Oozyten. Spuren: 01 Star, 02 Fshr, 03 Dnmt1, 04 Zp2, 05 Zp1, 06 Oosp1, 07 Star, 08 Fshr, 09 Dnmt1, 10 Zp2, 11 Zp1, 12 Oosp1, 13 Gapdh, 14 Lhcgr, 15 Lhcgr.

Die Quantifizierung der Oozyten-Anreicherung erfolgte mittels QPCR (Abb. 4.10). Die relative Expression der Gene im Ovar wurde als Referenz jeweils gleich eins gesetzt. Die Anreicherung von Zp1 auf den 89 fachen Wert in der Oozyten-Fraktion ist hoch signifikant. Noch deutlicher ist die 174 fache Anreicherung von Oosp1 im Vergleich zum Ovar. In der Leber sind beide Gene relativ zum Ovar nicht exprimiert. Dnmt1 und Zp2 wurden nicht ausgewertet, da die Schmelzkurvenanalyse der QPCR keine saubere Schmelzkurve ergab, was auf unspezifische Produkte hinweist, welche bei einer Quantifizierung zu falsch erhöhten Werten führen würde.

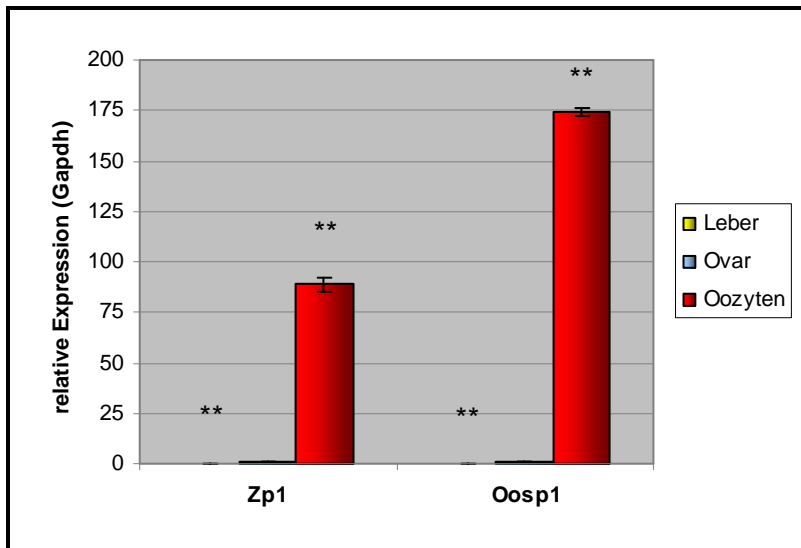


Abb. 4.10: Quantifizierung der Oozyten-Anreicherung mittels QPCR. Die Säulen visualisieren das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert für das Ovar (= 1). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten, (*) bei $p < 0,05$ und (**) bei $p < 0,01$. Zp1 und Oosp1 sind in Oozyten hoch signifikant erhöht.

Neben der Anreicherung von mRNA Oozyten-spezifischer Proteine wurde eine starke Verunreinigung der Oozyten-Fraktion durch ebenfalls aspirierte Zellfragmente, vor allem aus umliegenden Follikelepithelzellen, ausgeschlossen. Als Beleg wurden die in Tab. 4.3 aufgeführten Primerpaare benutzt. Diese Gene sind spezifisch für Zellen aus dem Ovar und sollten in Oozyten selbst nicht exprimiert sein.

Tab. 4.3: Primer Oozyten-Verunreinigung (alphabetisch)

Primer	Protein (mus musculus)	Kommentar
Fshr	follicle stimulating hormone receptor	ausgewertet
Lhcgr	luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor	ausgewertet
Star	steroidogenic acute regulatory protein	Schmelzkurve unsauber

Abb. 4.9 zeigt in Spur 01, 02 und 14 klare Banden für die Expression der Gene Star (Fragment: 65 bp), Fshr (69 bp) und Lhcgr (71 bp) im Ovar. Mit oözytärer cDNA hingegen waren keine Banden für die untersuchten Gene Star, Fshr und

Lhcgr nachweisbar, was die Spuren 07, 08 und 15 deutlich belegen. Die Quantifizierung der Kontamination durch QPCR ist in Abb. 4.11 dargestellt. Star wurde nicht berücksichtigt, da sich bei der Schmelzkurvenanalyse der QPCR ein zweiter Peak zeigte (Abb. 4.8). Die Ergebnisse bestätigen die signifikante Expressionsverringering von Lhcgr und Fshr im Vergleich zum gesamten Ovar als Referenzgewebe. Quantitativ belief sich diese in den Oozyten Proben auf 4 % des Wertes im Ovar und bei Lhcgr und auf 15 %. Beide Gene sind in der Leber relativ zum Ovar nicht exprimiert.

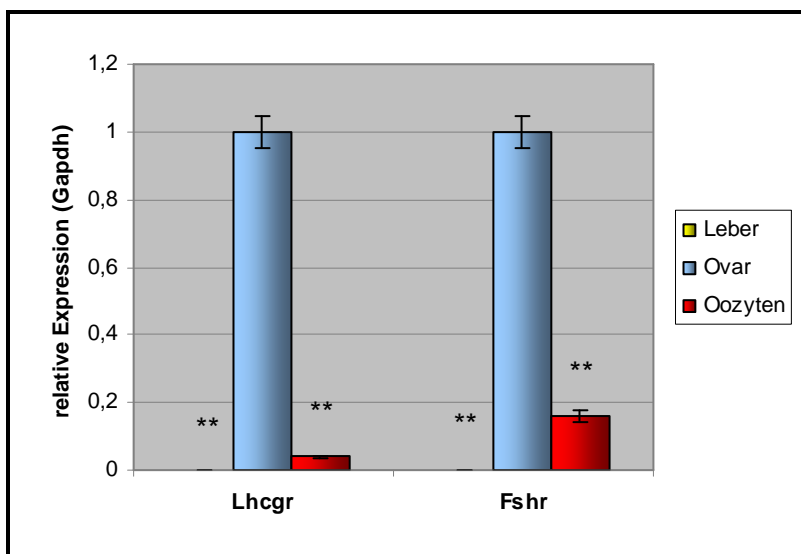


Abb. 4.11: Quantifizierung der Oozyten-Verunreinigung mittels QPCR. Die Säulen visualisieren das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert für das Ovar (= 1). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten, (*) bei $p < 0,05$ und (**) bei $p < 0,01$. Lhcgr und Fshr sind in Oozyten hoch signifikant verringert.

4.4.3 Analyse der mRNA Expression Peroxisomen-bezogener Gene

Nach Etablierung und dem Beleg der Reinheit der Oozyten-Präparation waren die Grundlagen für die Analyse der oozytären Expression peroxisomaler Gene geschaffen. Zunächst wurden die Primer, wie schon bei den nicht-peroxisomalen Proteinen beschrieben, etabliert (Abb. 4.12). Die Abbildung zeigt die komplette Übersicht über die Agarosegelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente, die durch Primer entstanden, welche zum Nachweis peroxisomaler mRNA Expression eingesetzt wurden. Die Untersuchung der mRNA

charakteristischer Proteine für die verschiedenen Stoffwechselwege von Peroxisomen ermöglichte eine erste funktionelle Charakterisierung von Peroxisomen in murinen Oozyten. Im Gegensatz zur Analyse der Qualität der Oozyten-Fraktionen, war die Referenz bei der Expressionsanalyse Peroxisomen-bezogener Gene die Leber. In Lebergewebe sind Peroxisomen sehr gut untersucht und die Expression peroxisomaler Gene wurde hier oft beschrieben. Für die quantitative Analyse wurde die Genexpression in der Leber gegen Gapdh ermittelt und gleich eins gesetzt, womit die Expression peroxisomaler Gene in Oozyten und im Ovar prozentual zum Level in Lebergewebe angegeben ist.

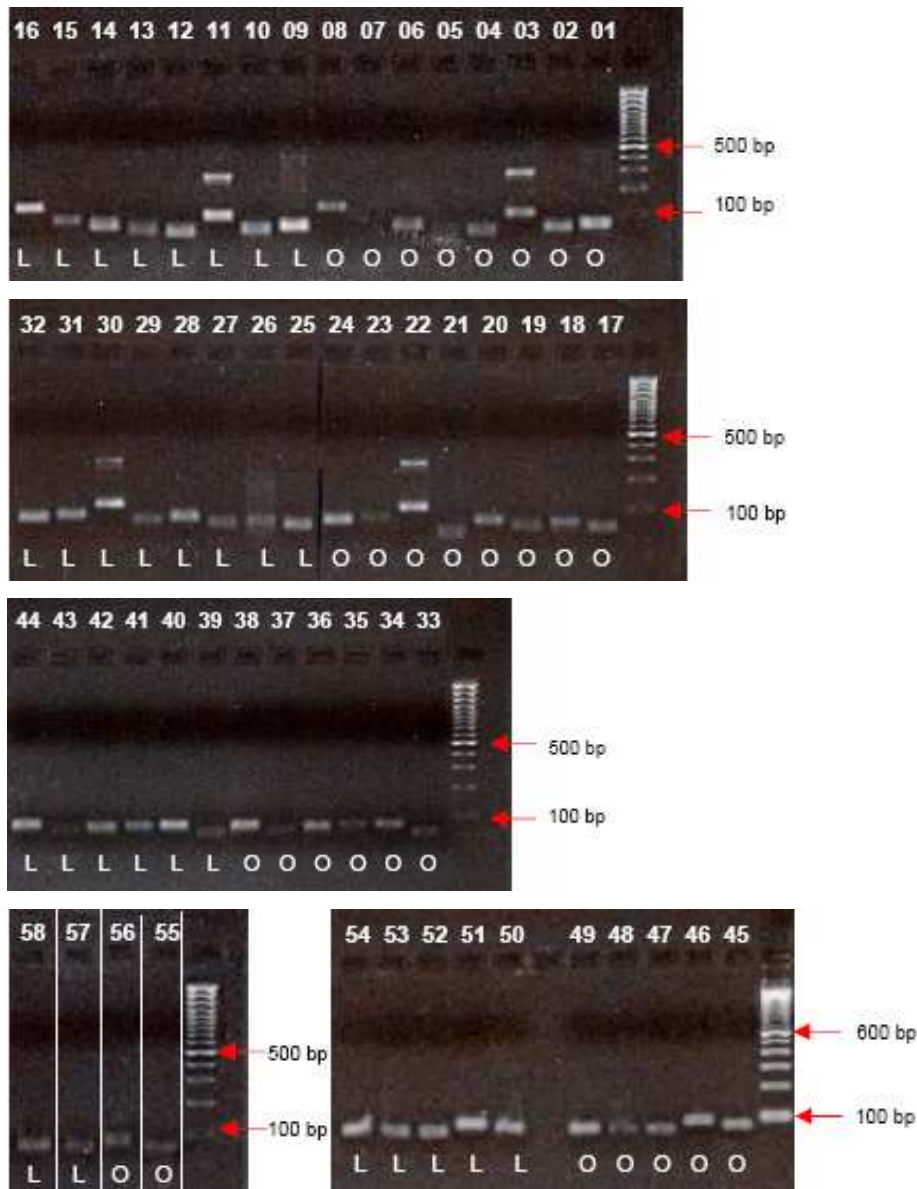


Abb. 4.12: Gelbilder zum Nachweis peroxisomaler Gene. Gezeigt sind mit EtBr gefärbte Agarosegele. An der DNA-Leiter sind die 100 bp und die 500 bp bzw. 600 bp Marke gekennzeichnet. Oben im Bild sind die Spuren nummeriert und unten die Template cDNA gekennzeichnet: (L) bedeutet Leber und (O) bedeutet Ovar. Spuren: 01 Sod1, 02 Sod2, 03 Acox3, 04 Mfp2, 05 Pxmp2, 06 Dhapat, 07 ThiolaseB, 08 Pex13, 09 Sod1, 10 Sod2, 11 Acox3, 12 Mfp2, 13 Pxmp2, 14 Dhapat, 15 ThiolaseB, 16 Pex13, 17 Pex14, 18 Pex16, 19 Pex19, 20 Aox, 21 Acox2, 22 Acoc3, 23 Pbe, 24 Gapdh, 25 Pex14, 26 Pex16, 27 Pex19, 28 Aox, 29 Acox2, 30 Acoc3, 31 Pbe, 32 Gapdh, 33 Dhap-S, 34 Gstk1, 35 Pex3, 36 Pex5, 37 Pex7, 38 Gapdh, 39 Dhap-S, 40 Gstk1, 41 Pex3, 42 Pex5, 43 Pex7, 44 Gapdh, 45 Cat(a), 46 Cat(b), 47 Gsr, 48 Abcd3, 49 Gpx1, 50 Cat(a), 51 Cat(b), 52 Gsr, 53 Abcd3, 54 Gpx1, 55 ThiolaseA, 56 Abcd1, 57 ThiolaseA, 58 Abcd1.

4.4.4 Verminderter Metabolismus reaktiver Sauerstoffverbindungen

Der Metabolismus reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS), mit der Produktion und dem Abbau von Wasserstoffperoxid, gehört zu den am längsten bekannten Stoffwechselleistungen von Peroxisomen. Die wichtigsten Gene dieses Stoffwechselweges wurden charakterisiert und sind in Tab. 4.4 aufgeführt. Für das Leitenzym, die Katalase, wurden zwei unterschiedliche Primerpaare Cat(a) und Cat(b) getestet. Jedes Paar erkennt eine unterschiedliche Nukleotidsequenz, aber beide weisen die Expression desselben Gens nach. Nahezu identische quantitative Ergebnisse dieser beiden Primerpaare wurden als methodischer Validitätsnachweis gewertet.

Tab. 4.4: Primer ROS-Metabolismus (alphabetisch)

Primer	Protein (mus musculus)	Kommentar
Cat (a)	catalase	ausgewertet
Cat (b)	catalase	ausgewertet
Gpx1	glutathione peroxidase 1	ausgewertet
Gsr	glutathione reductase 1	Schmelzkurve unsauber
Gstk1	glutathione S-transferase kappa 1	ausgewertet
Sod1	superoxide dismutase 1	PCR Bande unspezifisch
Sod2	superoxide dismutase 2	ausgewertet

Das nicht weiter berücksichtigte Sod1-Primerpaar produzierte neben einer spezifischen Bande weitere unspezifische Produkte (Abb. 4.12). Mit den Primerpaaren der Gene Cat(a) (Fragment: 80 bp), Cat(b) (90 bp), Gpx1 (76 bp), Gsr (67 bp), Gstk1 (78 bp) und Sod 2 (67 bp) ergaben sich deutliche spezifische Banden in den Leber cDNA Proben und spezifische Banden schwächerer Intensität im Ovar (s. Legende). Die weitere Quantifizierung mittels QPCR ergab insgesamt eine deutliche Reduktion der Expression sämtlicher getesteter Gene im gesamten Ovar und eine noch geringere Expression in Oozyten. Alle Ergebnisse waren statistisch hoch signifikant. Die Synchronität von Cat(a) und Cat(b) mit einem gleichen Expressionslevel von 4 % im Ovar und 1 % in Oozyten wurde bereits angesprochen. Die Aktivität von Gpx1 und Gstk1 war bei 10 % bzw. 11 % im Ovar und bei 2 % bzw. 7 % der hepatischen

Expression in Oozyten. Sod2 als überwiegend mitochondriales Protein hatte eine etwas höhere Expression von 32 % im Ovar und 23 % in Oozyten. Gsr wurde nicht ausgewertet, da die Schmelzkurvenanalyse der QPCR nicht sauber war.

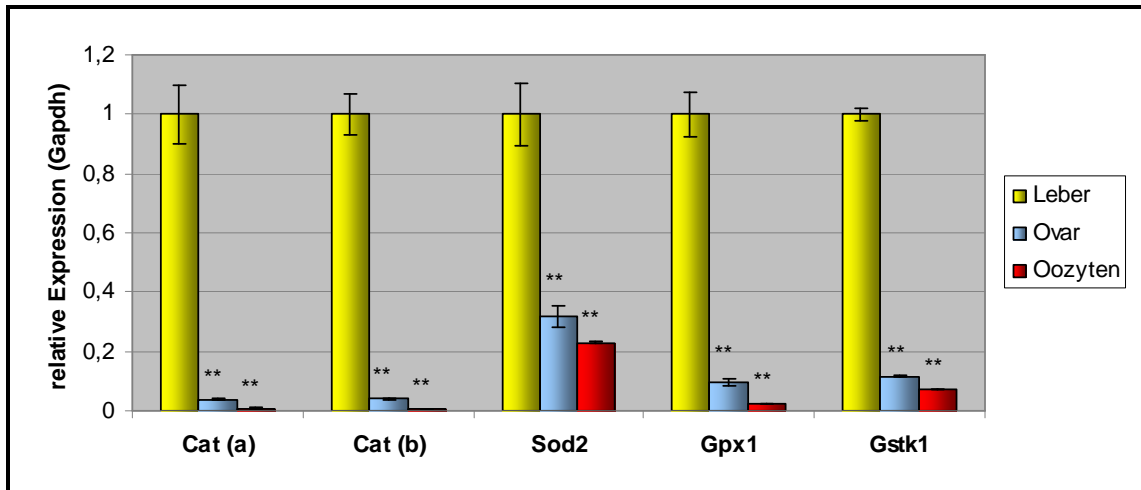


Abb. 4.13: Quantifizierung des ROS-Metabolismus mittels QPCR. Die Säulen visualisieren das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert für die Leber (= 1). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten, (*) bei $p < 0,05$ und (**) bei $p < 0,01$. Alle Gene sind in Oozyten und im Ovar hoch signifikant verringert.

4.4.5 Vergleichbare Expressionslevel bei der Biogenese

Bis heute sind eine ganze Reihe von Peroxinen bekannt, die essentielle Aufgaben bei der Biogenese der Peroxisomen erfüllen. Sie sind vor allem am Aufbau der peroxisomalen Membran, dem Import von Matrixproteinen über die Zellmembran und an der Proliferation von Peroxisomen beteiligt. Folgende in Tab.4.5 aufgelistete Gene der peroxisomalen Biogenese wurden in dieser Arbeit untersucht:

Tab. 4.5: Primer peroxisomale Biogenese (alphabetisch)

Primer	Protein (mus musculus)	Kommentar
Pex3	peroxisome biogenesis factor 3	ausgewertet
Pex5	peroxisome biogenesis factor 5	ausgewertet
Pex7	peroxisome biogenesis factor 7	ausgewertet

Pex13	peroxisome biogenesis factor 13	Schmelzkurve unsauber
Pex14	peroxisome biogenesis factor 14	ausgewertet
Pex16	peroxisome biogenesis factor 16	PCR Bande unspezifisch
Pex19	peroxisome biogenesis factor 19	ausgewertet

Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese sind ebenfalls in Abb. 4.12 dargestellt. Ausgeschlossen wurden die Pex16 und Pex13 Primerpaare. Die Primer der Gene Pex3 (76 bp), Pex5 (73 bp), Pex7 (64 bp), Pex13 (136 bp), Pex14 (60 bp) und Pex19 (62 bp) ergaben deutlich spezifische Banden in der Leber cDNA und ähnlich starke oder etwas schwächere Banden im Ovar (Spuren siehe Legende). Pex7 ist in beiden Proben auffallend schwächer als die anderen. Die Ergebnisse der QPCR sind in Abb. 4.14 dargestellt. Allgemein war die Expression peroxisomaler Biogenesegene in der Tendenz in Oozyten, Ovar und Leber auf einem ähnlichen Level. Geringe Veränderungen waren hierbei oft statistisch nicht signifikant verändert. So ist die Expression von Pex19 in allen untersuchten Geweben gleich stark. Pex5 zeigte im Ovar und Oozyten vergleichbare Werte von 57 % und 63 %, wobei nur die oozytäre Reduktion hoch signifikant war. Pex7 war mit 74 % in Oozyten ebenfalls nicht signifikant vermindert, aber deutlich stärker exprimiert als mit 32 % im Ovar. Die Expression in Oozyten von Pex3 auf das 1,52 fache und von Pex14 sogar auf das 2,69 fache der hepatischen Werte war statistisch hoch signifikant. Im gesamten Ovar war die Expression von Pex14 nicht signifikant verändert, die von Pex3 hingegen auch auf 60 % reduziert. Zusammenfassend ist die oozytäre Expression der Biogenesegene mit der hepatischen Expression vergleichbar, mit einer Tendenz zu höheren Niveaus bei Pex3 und Pex14.

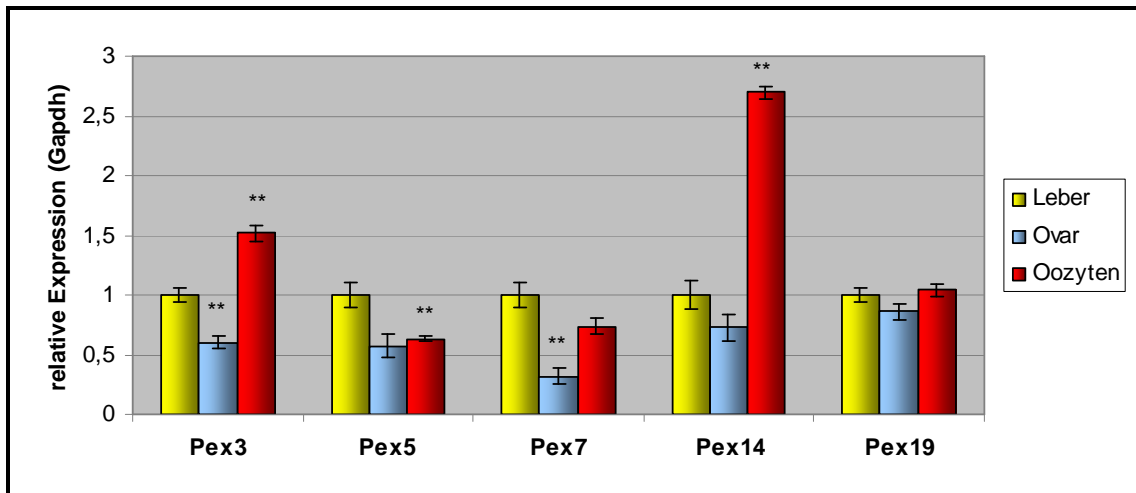


Abb. 4.14: Quantifizierung der peroxisomalen Biogenese mittels QPCR. Die Säulen zeigen das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert für die Leber (= 1). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten, (*) bei $p < 0,05$ und (**) bei $p < 0,01$. In Oozyten sind Pex3 und Pex14 hoch signifikant erhöht, Pex7 und Pex19 nicht signifikant verändert und ist Pex5 hoch signifikant verringert.

4.4.6 Deutliche Reduktion der Oxidation

Die β -Oxidation von Fettsäuren ist als wichtiger Stoffwechselweg in den Peroxisomen nahezu aller Organismen vertreten und läuft bei höheren Eukaryonten in Mitochondrien und Peroxisomen ab. Folgende in Tab. 4.6 aufgelisteten Gene der peroxisomalen β -Oxidation von Fettsäuren wurden hinsichtlich der mRNA Expression untersucht:

Tab. 4.6: Primer Oxidation (alphabetisch)

Primer	Protein (mus musculus)	Kommentar
Aox	acyl-Coenzym A oxidase 1, palmitoyl	ausgewertet
Acox2	acyl-Coenzym A oxidase 2, branched chain	ausgewertet
Acox3	acyl-Coenzym A oxidase 3, pristanoyl	PCR Bande unspezifisch
Mfp2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4 (Multifunctional protein 2)	ausgewertet

Pbe	enoyl-Coenzym A, hydratase / 3-hydroxyacyl Co-A dehydrogenase (Multifunctional protein 1)	ausgewertet
ThiolaseA	3-ketoacyl-Coenzym A thiolase A	ausgewertet
ThiolaseB	3-ketoacyl-Coenzym A thiolase B	ausgewertet

Das Produkt der Acox3-Primer zeigte in der gelelektrophoretischen Auftrennung neben einer spezifischen Bande (107 bp) eine zweite unspezifische Bande (Abb. 4.12). Die Fragmente der übrigen ausgewählten Gene sind ebenfalls in Abb. 4.12 gezeigt. Für Aox (73 bp), Acox2 (67 bp), Mfp2 (61 bp), Pbe (80 bp) und ThiolaseA (68 bp) sind deutlich spezifische Banden in Leber cDNA Proben und schwächere Banden im Ovar nachweisbar. ThiolaseB (89 bp) konnte in der cDNA des Ovars nicht nachgewiesen werden, war in der Leber aber als korrekter Balken sichtbar. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung sind in Abb. 4.15 dargestellt. Insgesamt war auch die Expression aller untersuchten Gene für die Oxidation von Fettsäuren, in Oozyten und im Ovar deutlich und hoch signifikant vermindert. Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte: Die Expression von Aox war mit 6 % im Ovar und mit 1 % in Oozyten weit unter der hepatischen Expression. Noch geringere Level zeigten Acox2 und Pbe, welche im Ovar beide bei 1 % lagen und in den Oozyten mit 0,4 % bzw. 0,2 % kaum nachweisbar waren. Mfp2 erreichte 24 % im Ovar und 29 % in Oozyten. Thiolase A zeigte im Ovar mit 55 % die stärkste mRNA Expression unter den Proteinen der Oxidation, erreichte aber in oozytärer mRNA geringere 20 %. Eine ebenfalls sehr schwache Aktivität konnte für Thiolase B gezeigt werden. Die Expression erreichte im Ovar nur 1 % und in Oozyten nur 2 % der Aktivität in der Leber.

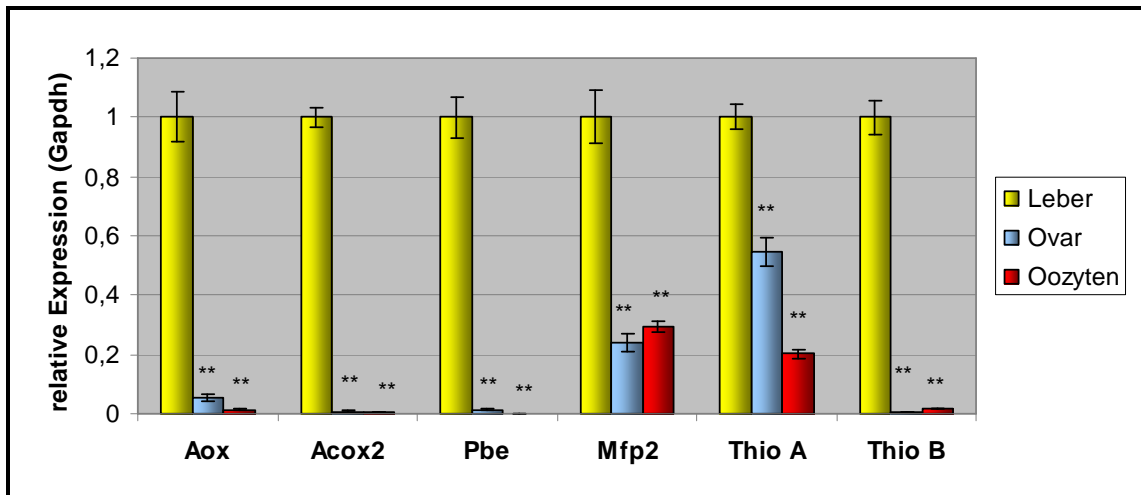


Abb. 4.15: Quantifizierung des oxidativen Stoffwechsels mittels QPCR. Die Säulen visualisieren das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert für die Leber (= 1). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten, (*) bei $p < 0,05$ und (**) bei $p < 0,01$. Alle Gene sind in Oozyten und im Ovar hoch signifikant verringert.

4.4.7 Starke Ausprägung der Etherlipidsynthese in den Peroxisomen der Oozyte

Die Etherlipid-Biosynthese (Plasmalogen-Biosynthese) ist ein weiterer wichtiger Stoffwechselweg, dessen Schlüsselreaktionen in Peroxisomen stattfinden. Plasmalogene, die häufigsten Etherlipide, machen beim Menschen ca. 18 % der gesamten Phospholipide aus. Phospholipide sind amphiphile, phosphorhaltige Lipide und z.B. Grundlage für den Aufbau der Doppellipidschichten vieler Zellen. Membranen mit besonders großem Plasmalogenanteil finden sich u.a. in Gehirn, Herz, Lunge, Niere, Milz, Skelettmuskel und Hoden. Tab. 4.7 zeigt die untersuchten Gene der Etherlipidsynthese.

Tab. 4.7: Primer Etherlipidsynthese (alphabetisch)

Primer	Protein (mus musculus)	Kommentar
Dhapat	glyceronephosphate O-acyltrans-ferase	ausgewertet
Dhap-S	alkylglycerone phosphate synthase	ausgewertet

Die QPCR Ergebnisse sind in Abb. 4.16 gezeigt. Auffallend ist, dass Gene der Etherlipidsynthese schon im gesamten Ovar aber besonders in Oozyten stark

exprimiert werden. Das Primerpaar für Dhapat führte zu klaren spezifischen Banden (74 bp) in der Leber und im Ovar (Abb. 4.12). Quantitativ entsprach das Expressionsniveau im Ovar dem hepatischen. Signifikant war hingegen die Steigerung der Werte auf das 1,18 fache in Oozyten. Auch die Primer zum mRNA Nachweis von Dhap-S zeigten bei der Agarose-Gelelektrophorese spezifische Banden in Lebergewebe und im Ovar (62 bp). Hoch signifikant war die relative Expressionserhöhung von Dhap-S in ovariellen Gewebe auf das 2,68 fache. Somit ist Dhap-S das einzige getestete Gen, welches im gesamten Ovar eine höhere Expression hatte als in der Leber. Noch deutlicher ist das erhöhte Expressionsniveau in Oozyten. Hier erreicht Dhap-S den 6,54 fachen Wert im Vergleich zur Expression der Leber. Solch eine deutliche Induktion in Oozyten zeigte kein anderes der getesteten Gene. Somit haben die Schlüsselreaktionen der Etherlipid-Biosynthese in Peroxisomen der Oozyte ein deutlich höheres Expressionslevel als in Peroxisomen der Leber.

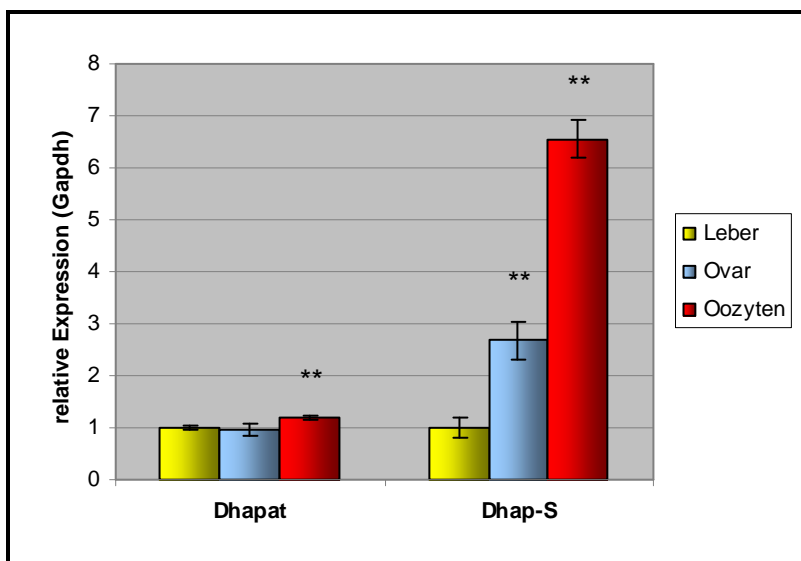


Abb. 4.16: Quantifizierung der Etherlipidsynthese mittels QPCR. Die Säulen visualisieren das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert für die Leber (= 1). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten, (*) bei $p < 0,05$ und (**) bei $p < 0,01$. Dhapat und Dhap-S sind in Oozyten hoch signifikant erhöht, im Ovar ist Dhapat nicht signifikant verändert und Dhap-S auch hoch signifikant erhöht.

4.4.8 Unterschiedliche Expression der Membranproteine

Als weitere Gruppe sind die Membranproteine Abcd1, Abcd3 (Pmp70) und Pxmp2 getestet worden. In dieser Gruppe konnten alle getesteten Gene ausgewertet werden (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Primer Membranproteine (alphabetisch)

Primer	Protein (mus musculus)	Kommentar
Abcd1	ATP-binding cassette, sub-family D, member 1 (Adrenoleukodystrophy prot.)	ausgewertet
Abcd3	ATP-binding cassette, sub-family D, member 3 (perox. 70kDa membr. prot.)	ausgewertet
Pxmp2	peroxisomal 22kDa membrane protein	ausgewertet

Abb. 4.12 zeigt erneut den Agarosegellauf. Abcd1 (72 bp), Abcd3 (72 bp) und Pxmp2 (65 bp) mit Leber cDNA und mit cDNA aus Ovar (Spuren siehe Legende). Die QPCR zeigte keine einheitliche Tendenz für alle getesteten Membranproteine (Abb. 4.17). Im Ovar war die Expression von Pxmp2 2 % und die von Abcd3 12 %. Abcd3 weist mit 13 % in Oozyten eine ähnliche Aktivität wie im Ovar auf, in beiden Proben lag diese aber deutlich unter dem Niveau der Leber. Ebenso verhielten sich die Expressionslevel von Pxmp2. Wobei die Aktivität von Pxmp2 in Oozyten mit 14 % etwas höher war als im gesamten Ovar mit nur 2 %. Die ermittelten Werte waren statistisch hoch signifikant. Anders verhielt es sich bei Abcd1, dessen Level im Ovar nicht signifikant verändert war. In Oozyten war die Expression mit 74 % zwar schon signifikant reduziert, aber deutlich näher am Niveau der Leber als die Werte der beiden anderen analysierten Gene der Membranproteine.

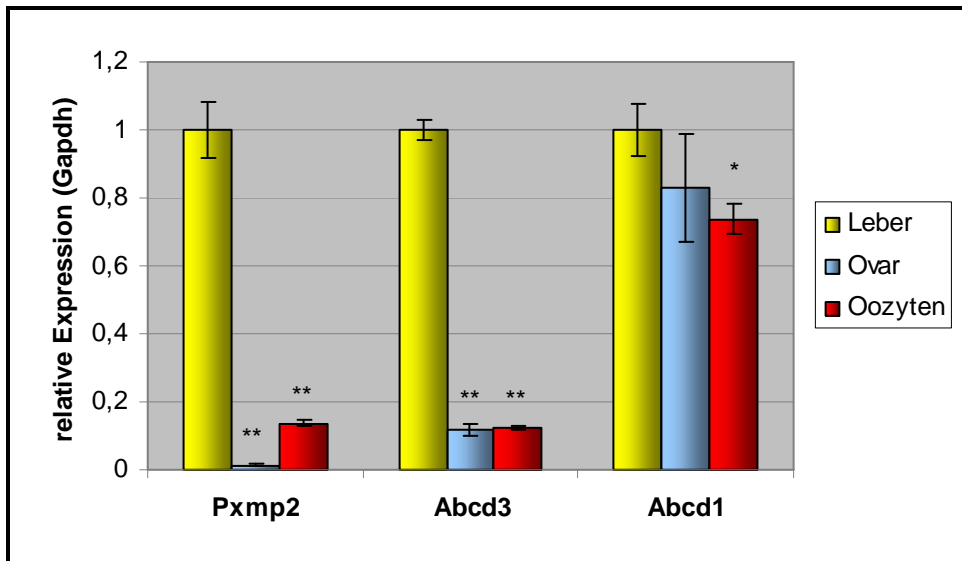


Abb. 4.17: Quantifizierung der Membranproteine mittels QPCR. Die Säulen visualisieren das Verhältnis der relativen, auf Gapdh bezogenen, Genexpression für das angegebene Gewebe in Relation zu diesem Wert für die Leber (= 1). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte +/- Standardfehler aus jeweils sechs Experimenten, (*) bei $p < 0,05$ und (**) bei $p < 0,01$. Pxmp2 und Abcd3 sind in Oozyten und im Ovar hoch signifikant verringert, Abcd1 ist im Ovar nicht signifikant verändert und in Oozyten etwas verringert.

5. DISKUSSION

5.1 Überblick

Über die Existenz von Peroxisomen in Oozyten ist, vor allem was deren Funktion betrifft, bis heute wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, Peroxisomen in Oozyten mit morphologischen Methoden wie Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie nachzuweisen. Ein für Peroxisomen „typisches“ Färbemuster war in allen Stadien der Follikulogenese nachweisbar, wobei es mit zunehmender Reifung der Oozyte zur Proliferation von Peroxisomen kam. Zudem konnten positive Kolokalisationsanalysen mittels spezifischen Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen peroxisomale Proteine durchgeführt werden. Nach der Isolation von Oozyten konnte anhand spezifischer mRNA die oozytäre Expression peroxisomaler Markerproteine untersucht werden. Hierbei zeigte sich ein neues, im Vergleich zur Leber anderes, Zelltyp-spezifisches Profil der mittels Sybr Green basierter real-time PCR bestimmten Expressionslevel. Die Auswertung dieser, für peroxisomale Stoffwechselwege und die peroxisomale Biogenese charakteristischen Markerproteine, erlaubte erstmals eine Aussage über die Einbindung von Peroxisomen in den oozytären Metabolismus.

5.2 Zunahme der Peroxisomendichte

Der optische Eindruck in der Immunfluoreszenzmikroskopie verschiedener Follikelstadien bewirkte die Annahme einer massiven Proliferation von Peroxisomen während der Follikulogenese. Die Auszählung der einzelnen Follikelstadien ergab eine Verdreifachung der Peroxisomenanzahl vom Primordialfollikel (kleine Oozyte bis 20 µm) zum Primärfollikel (kleine oder schon wachsende Oozyte). Vom Primärfollikel zum Sekundär- bzw. Tertiärfollikel mit großer Oozyte (Oozytendurchmesser 70 µm) kam es nochmals zu einer 12 fachen Vermehrung der Anzahl an Peroxisomen. Dies spiegelt nur eine grobe Einschätzung der Proliferation wieder, da es bei der

Auszählung von Peroxisomen zur Beurteilung der Proliferation schwierig war repräsentative Schnittebenen mit den unterschiedlichen Follikelstadien auszuwählen. Die Größe der ausgezählten Fläche, und somit auch die mögliche Anzahl der Peroxisomen, hing von der gewählten Schnittebene der eigentlich dreidimensionalen Oozyte und von der Größe des Zellkernanschnitts ab. Dennoch ergab sich eine bedeutende Frage: Proliferieren die Peroxisomen im Verlauf, wie es den subjektiven Anschein hat, wirklich so stark, dass sich die Dichte an Peroxisomen erhöht? Oder ist es so, dass Peroxisomen zwar proliferieren, aber dies in etwa proportional zur Volumenzunahme der Oozyte steht und die Peroxisomendichte somit auch in den reiferen Follikelstadien nicht ansteigt? Die Flächenveränderung von den kleinsten ausgezählten Flächen (Primordialfollikel, $d=15\ \mu\text{m}$) zu den größten ($d=70\ \mu\text{m}$) ergab eine Veränderung um höchstens Faktor 20. Da diese errechneten Werte der Flächenzunahme die Zunahme der Peroxisomenanzahl nicht übersteigen, muss die Dichte an Peroxisomen während der Follikulogenese zunehmen. Nach Etablierung der zellbiologischen Methoden in dieser Arbeit sollte dieser Eindruck in weiteren Arbeiten durch exakte quantitative Analysen mit größerem Probenumfang und objektiven Zähl- und Messmethoden statistisch signifikant bestätigt werden.

5.3 Morphologie der Peroxisomen in Oozyten

Die Immunfluoreszenzmarkierung peroxisomaler Antigene in Oozyten zeigte mit den Primärantikörpern α -Pmp70, α -Cat und α -Pex14 kleine, punktförmige, „Peroxisomen-typische“ Markierungen. Daneben waren durchweg aber auch einige „plumpe“ teils „schollig“ wirkende Strukturen sichtbar. Dieses Muster zeigte sich bei Schnitten nach Paraffineinbettung und Kryokonservierung. Auch für perfusionsfixierte und immersionsfixierte Ovarien mit unterschiedlichen Fixierlösungen bestätigte sich dieses Färbemuster. Da die Gewebekonservierung nach unterschiedlichen Prinzipien erfolgte, ist eine identische artifizielle Veränderung der Antigenstrukturen sehr unwahrscheinlich. Zudem machte die durchgeführte positive Kolokalisationsanalyse unwahrscheinlich, dass es sich bei den Markierungen um Proteine oder Proteinaggregate handelte. Somit konnten die unterschiedlichen

Fluoreszenzsignale als morphologische Unterschiede durch z.B. elongierte Peroxisomen interpretiert werden. Um diese morphologischen Unterschiede der Peroxisomen weiter zu erhärten, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die markierten Peroxisomen zeigten im Elektronenmikroskop jedoch keine untypische Form. Die markierten Peroxisomen stellten sich nicht homogen in der Oozyte verteilt dar, sondern waren gelegentlich in kleinen Gruppen angehäuft. Dies führte abschließend zu der Annahme, dass die „plumpen“ teils „scholligen“ Peroxisomenmuster der Immunfluoreszenzmikroskopie nicht durch morphologische Unterschiede, sondern durch das gruppenhafte Anhäufen von Peroxisomen mit „typischer“ punktförmiger Markierung an einer Stelle, bedingt ist. Diese dichte Anhäufung übersteigt das Auflösungsvermögen der Lichtmikroskopie, weshalb an diesen Stellen größere, plumpe Strukturen als Fluoreszenzsignal erscheinen.

5.4 Anreicherung der Oozyten-spezifischen Gene Zp1 und Oosp1

Zur Quantifizierung der Anreicherung von Oozyten wurde die Expression der Oozyten-spezifischen Gene Oosp1 (Paillisson et al. 2005; Yan et al. 2001) und Zp1 (Epifano et al. 1995) in der Oozyten-Fraktion, im Vergleich zum gesamten Ovar, bestimmt. Während die Zonaproteine in der Maus ausschließlich von der Oozyte sezerniert werden (Epifano et al. 1995; Soyak et al. 2000), haben beim Menschen, wie auch bei anderen Spezies, die Granulosazellen ebenfalls einen Anteil an der Synthese der Zonaproteine (Bogner et al. 2004; Sinowatz et al. 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine hoch signifikante 89 fache Anreicherung von Zp1 und eine 174 fache Anreicherung von Oosp1 in der Oozyten-Fraktion im Vergleich zum gesamten Ovar (Abb. 4.10). Es ist beschrieben, dass die Expressionslevel von Zp1 während der Follikulogenese stark variieren. Während Zp1 in Primordialfollikeln noch nicht nachweisbar ist, kommt es mit fortschreitender Follikulogenese zu einem Expressionsmaximum, welches bei reiferen Stadien wieder regredient ist (Epifano et al. 1995). Aus diesem Grund kann eine Korrelation mit den Werten von Oosp1 nicht exakt gegeben sein. Vermutlich ist dieser Expressionsunterschied durch die

hauptsächlich gepickten, reiferen Follikelstadien bedingt. Eine definitive Bestätigung des in der Oozytenfraktion vorherrschenden Stadiums anhand der unterschiedlichen Expression dieser Gene war aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit relativer Expressionslevel mit der Literatur nicht möglich.

5.5 Reduktion der nicht oozytären Gene Lhcgr und Fshr

Neben der Anreicherung Oozyten-spezifischer Gene sollte als Qualitätskriterium für die Oozyten-Isolierung auch eine deutliche Reduktion nicht oozytärer Gene gezeigt werden. Dazu wurden die Expressionslevel der Gene Lhcgr und Fshr bestimmt. Der Fsh-Rezeptor konnte im Ovar exklusiv in Granulosazellen (Simoni et al. 1997) und der LH-Rezeptor exklusiv in Thecazellen unreifer Follikel und in Thecazellen und Granulosazellen reiferer Follikel mittels in situ Hybridisierung in Rattenovarien gezeigt werden (Camp et al. 1991). Beide unterliegen zyklusspezifischen Schwankungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine hoch signifikante Expressionsverringerung von Lhcgr auf 4% und von Fshr auf 15% im Oozyten-Pool, im Vergleich zur Expression im gesamten Ovar (Abb. 4.11). Verstärkend kommt noch hinzu, dass nur ein gewisser Anteil des Ovars aus Granulosazellen und Thecazellen besteht, was für die relative Quantifizierung mittels QPCR bedeutet, dass schon das Referenzgewebe nur eine geringere Expression an diesen Genen aufweist. Hierdurch erscheint der Nachweis in Oozyten prozentual höher. Die Ergebnisse spiegeln wahrscheinlich den methodisch bedingten Unterschied der Verunreinigung mit wenigen Thecazellen und etwas mehr Granulosazellen wieder. Lhcgr kommt vorwiegend aus den peripher liegenden Thecazellen, von denen die Oocyte leichter zu separieren war als von den dicht anliegenden Granulosazellen, die Fshr exprimieren. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Expressionsanalysen charakteristischer Markerproteine für peroxisomale Stoffwechselwege und die peroxisomale Biogenese, durch eine mRNA Verunreinigung nicht entscheidend beeinflusst wurden.

5.6 Gapdh als house-keeping Gen

Auch anerkannte house-keeping Gene wie Gapdh werden nicht in allen Geweben konstant stark exprimiert. Barber et al. zeigten mRNA Expressionsunterschiede für Gapdh in 72 unterschiedlichen menschlichen Geweben. Die mRNA Kopienanzahl war hierbei in Lebergewebe ca. doppelt so hoch wie im Ovar (Barber et al. 2005). Wie verhält sich Gapdh insbesondere während der Oogenese? Eine Validierung von Referenzgenen in murinen Oozyten und Embryonen in vivo und in vitro ergab variable Genexpressionslevel für Gapdh. Hierbei nahm das Expressionslevel von Gapdh von der Oozyte zu diversen Präimplantationsstadien signifikant zu (Mamo et al. 2007). Korrespondierende Ergebnisse zeigten sich in Hasen-Oozyten (Mamo et al. 2008). Auch andere Autoren zeigten bei der Analyse der Zusammensetzung des Proteoms in verschiedenen Entwicklungsstadien, dass Gapdh in embryonalen Stammzellen hochreguliert wird (Wang et al. 2010). Der genaue Unterschied der tatsächlichen Expressionslevel von Gapdh in Lebergewebe und Oozyten bleibt offen. Die Literatur zeigt aber Schwankungen der Expression von Gapdh während der Embryogenese. Wenn somit die Expression von Gapdh in Oozyten eingeschränkt wäre, würde dies die Auswertung der relativen Expression Peroxisomen-bezogener Gene beeinflussen. Bei dieser wird angenommen, dass Gapdh in den Vergleichsgeweben gleich stark exprimiert wird wie in Oozyten und daran die Expressionsunterschiede des interessanten Gens quantifiziert. Die Ergebnisse der QPCR zeigten deutliche Expressionsunterschiede von Peroxisomen-bezogenen Genen zwischen den Oozyten und dem gesamten Ovar. Sowohl im Vergleich zur Leber, als auch zum Ovar gab es Gene, die in Peroxisomen deutlich höhere Expressionslevel zeigten, ebenso wie Gene die hier deutlich schwächer exprimiert wurden. Folglich muss ein Zelltyp-spezifischer Unterschied vorliegen, da unabhängig von der realen house-keeping Genexpression in Oozyten, der Unterschied einer dieser Gruppen immer noch deutlicher wird.

5.7 Expressionsmuster Peroxisomen-bezogener Gene in Oozyten

Die β -Oxidation ist eine der charakteristischen metabolischen Funktionen von Peroxisomen. Es konnte gezeigt werden, dass in murinen Oozyten sämtliche untersuchten Gene der β -Oxidation deutlich reduziert waren. Somit spielt vermutlich auch der Abbau von VLCFA, 2,4,6,10-Tetramethyl-pentadecansäure, langkettigen Dicarbonsäuren, einigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren, manchen Prostaglandinen und Leukotrienen, Xenobiotika sowie der Vitamine E und K ebenso wie die Gallensäuresynthese für Oozyten im Vergleich zur Leber eine geringere Rolle. Auch der Stellenwert des ROS-Metabolismus ist in Oozyten geringer als in der Leber. Für alle ausgewerteten Enzyme des ROS- und RNS-Metabolismus konnte eine hoch signifikante Reduktion der Expression schon im gesamten Ovar und eine noch geringere Expression in Oozyten gezeigt werden. Die Aktivität von Cat, Gpx1 und Gstk1 befand sich im niedrigen Prozentbereich. Sod2 als überwiegend mitochondriales Protein hatte eine etwas höhere Expression von 32 % im Ovar und 23 % in Oozyten. Während die Bildung und vor allem der Abbau von ROS und RNS in der Leber einen entscheidenden Anteil am Metabolismus der Peroxisomen einnimmt, scheinen diese Stoffwechselprozesse in Oozyten kaum von Bedeutung zu sein. Interessant ist, ob Oozyten generell geringerem oxidativem Stress ausgesetzt sind und deshalb die abbauende Funktion der Peroxisomen nicht so stark benötigen. Hierzu passt auch das reduzierte Expressionsniveau der Oxidasen. Möglich wäre auch eine Kompensation durch andere antioxidative Systeme. Demgegenüber konnte für die Gene der Etherlipidsynthese in Peroxisomen eine signifikante relative Expressionserhöhung gezeigt werden. Hierbei war Dhapat leicht über das Leberniveau erhöht und für Dhap-S konnte ein erhöhtes Expressionsniveau in Oozyten auf den 6,54 fachen Wert gezeigt werden. Selbst im gesamten Ovar war Dhap-S auf das 2,68 fache erhöht (Abb. 4.16). Solch eine deutliche Induktion in Oozyten zeigte kein anderes der untersuchten Gene. Somit haben die Schlüsselreaktionen der Etherlipid-Biosynthese in Peroxisomen der Oozyten ein deutlich höheres Expressionslevel als in Peroxisomen der Leber. Die Etherlipid-Biosynthese spielt daher vermutlich eine

wichtige Rolle im Stoffwechsel der Oozyten. Zusammenfassend konnte für Peroxisomen in Oozyten ein charakteristisches Zelltyp-spezifisches Expressionsmuster mit Reduktion des ROS-Metabolismus und der β -Oxidation und Induktion der Plasmalogensynthese im Vergleich zur Leber gezeigt werden. Hieraus leitet sich ab, dass Peroxisomen in Oozyten auch eine Zelltyp-spezifische Funktion haben müssen, bei der die Etherlipidsynthese eine besondere Rolle einzunehmen scheint.

5.8 Bedeutung der Etherlipide für die Oozyte

Durch den Etherlipidstoffwechsel haben Peroxisomen vor allem eine entscheidende Rolle beim Aufbau von Biomembranen. Für die Oozyte scheint der Aufbau von Biomembranen eine wichtige Aufgabe zu sein, denn neben dem Größenzuwachs während der Follikulogenese an sich, beginnen nach der Befruchtung die Furchungsteilungen. Aus der Zygote entsteht das Zweizell Stadium, das Vierzell Stadium usw. und nach ca. 96h die Morula (aus ca. 30 Blastomeren). In der Literatur wurde gezeigt, dass CHO Zelllinien ohne funktionsfähige Dhapat keine Plasmalogene produzieren (Wanders and Waterham 2006a). Schon isolierte Enzymdefekte von Dhapat oder Dhap-S sind mit schweren klinischen Manifestationen und mit einer intrauterinen Wachstumsretardierung vergesellschaftet, was sonst eher bei PBD wie dem Zellweger-Syndrom-Spektrum vorkommt. Zudem kam es bei Dhapat^(-/-) Mausembryonen vermehrt zum pränatalen Fruchttod (Rodemer et al. 2003). Weil die ersten Zellen alleine durch Furchung der Zygote entstehen und sich innerhalb der nicht dehnbaren Zona pellucida befinden, weist der Embryo noch kein Größenwachstum auf. Jede neue Zelle ist halb so groß wie die Zelle aus der sie hervorgegangen ist. Daraus leitet sich ein großer Bedarf an Biomembranen ab. Wird als Beispiel eine Kugel in 100 kleinere Kugeln geteilt, die zusammen das gleiche Volumen der Ausgangskugel haben, dann muss sich insgesamt die Oberfläche der 100 kleinen Kugeln um das 4,64 fache im Vergleich zur Oberfläche der Ausgangskugel vergrößern ($V_{\text{Kugel}} = \frac{4}{3}\pi r^3$, $A_{\text{Kugel}} = 4\pi r^2$). Das heißt, dass durch Teilung der Oozyte in nur 100 einzelne Zellen, schon das 4,64 fache an Biomembranen zusätzlich benötigt wird.

Der Grund einer Steigerung der Etherlipidsynthese für die Oozyte könnte zwei Ursachen haben. Einerseits wäre ein erhöhter Eigenbedarf bei der Vergrößerung ihrer Plasmamembran während der Follikulogenese möglich. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Art Vorratshaltung an Plasmalogenen der reifen Oozyten, um für die häufigen Teilungen in der frühen Embryogenese schnell ausreichend Biomembranen zur Verfügung stellen zu können. Die durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten multilamelläre Strukturen der oozytären Peroxisomen (Abb. 4.7 Bild D). Diese multilamellären Körper könnten als Hinweis für eine mögliche Vorratshaltung gedeutet werden. In weiterführenden Arbeiten könnte dieser Ansatz durch die Auswertung anderer, nicht peroxisomaler Gene die am Aufbau von Biomembranen beteiligt sind, weiter verfolgt und spezifiziert werden.

5.9 Deutliche peroxisomale Biogenese bei Reduktion der peroxisomalen Hauptfunktionen

Trotz deutlich reduzierter Expressionslevel bei Genen Peroxisomen-bezogener Hauptfunktionen wie dem ROS-Metabolismus und der β -Oxidation konnte gezeigt werden, dass die Expression der meisten Gene der peroxisomalen Biogenese in Oozyten, Ovar und Leber statistisch nicht signifikant verändert waren. Eine stärkere Expression konnte jedoch bei Pex3 auf das 1,52 fache der hepatischen Werte in Oozyten und bei Pex14 auf das 2,69 fache gezeigt werden. Diese Befunde unterstützen die Annahme einer regen Proliferation von Peroxisomen in Oozyten. Auch am Proteinimport und am Metabolittransport beteiligte Gene zeigten deutliche Expressionslevel. Die Importkapazität von Matrixproteinen durch die verschiedenen Peroxine zeigte sich vor allem am erhöhten Aktivitätslevel von Pex14, welches mit Pex13 die beiden Importrezeptoren Pex5 und Pex7 erkennt (Girzalsky et al. 2009). Weitere Membranproteine waren in Oozyten unterschiedlich stark exprimiert. Abcd1 war mit 74 % des Leberniveaus recht deutlich exprimiert, während die Expression von Pmp2 bei 14 % und die von Abcd3 (Pmp70) bei 13 % lag. Abcd1 arbeitet als Homodimer und ist am Transport von Acyl-CoA-Estern über die Membran beteiligt (van Roermund et al. 2008). Dessen stärkere Expression könnte durch

den Substratbedarf beim ersten Schritt der Etherlipidsynthese bedingt sein. Hierbei wird Acyl-Dhap aus Dhap und Acyl-CoA durch das peroxisomale Enzym Dhapat gebildet (Thai et al. 1997). Diese Ergebnisse der QPCR, mit deutlichen Anzeichen für peroxisomale Biogenese, decken sich mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz. Diese zeigten eine starke Proliferation der Peroxisomen mit einer Zunahme der Peroxisomendichte während der Follikulogenese.

5.10 Ausblick

Durch diese Arbeit konnte der Nachweis von Peroxisomen und die Charakterisierung einer Zelltyp-spezifischen Funktion dieser in Oozyten erbracht werden. Weiterhin bleibt eine vergleichende Differenzierung der mRNA Expression Peroxisomen-bezogener Gene während der einzelnen Stadien der Oogenese und der anschließenden Embryonalentwicklung offen. Insbesondere eine Charakterisierung der Expression Peroxisomen-bezogener Gene in den einzelnen Follikelstadien und deren Expressionsveränderungen von Primordialfollikeln zu Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikeln könnten weitere Erkenntnisse liefern. Eine solche Separation z.B. mittels Laser Microdissection war für diese Arbeit nicht möglich. Peroxisomale Aktivitätsunterschiede zwischen Oozyte und Zweizell Stadium bzw. Vierzell Stadium usw. könnten einen weiteren entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Rolle von Peroxisomen in der frühen Embryonal- und Fetalentwicklung liefern. Die für Oozyten als charakteristisch gezeigte vermehrte Plasmalogensynthese kann durch den erheblichen Membranzuwachs der Oozyte während der Follikelreifung, oder den erhöhten Membranbedarf bei den Furchungsteilungen während der frühen Embryonalentwicklung, erklärt werden. Oozytäre Lipidanalysen sind nun geplant, um die Bedeutung der peroxisomalen Plasmalogensynthese für die Reifung der Oozyten und die frühe Embryonalentwicklung genauer zu untersuchen. Weitere Untersuchungen könnten auch zu einem besseren Verständnis der Pathologien peroxisomaler Enzymdefekte und PBD beitragen und eventuelle Therapiemöglichkeiten dieser Krankheitsbilder weiter vorantreiben.

6. ZUSAMMENFASSUNGEN

6.1 Deutsche Zusammenfassung

Peroxisomen sind Zellorganellen mit einer Größe von 0,1 bis 1,5 μm , die in nahezu allen eukaryonten Zellen vorkommen. Sie erfüllen wichtige Aufgaben im intrazellulären Metabolismus von Lipiden und von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Peroxisomen sind dynamische Organellen, deren Gestalt und Enzymausstattung an wechselnde metabolische Bedingungen angepasst werden kann und deren Funktionen in verschiedenen Geweben oder Spezies variiert. Über die Funktion von Peroxisomen in den weiblichen Keimzellen ist bisher nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Peroxisomen in den Oozyten der Maus zu charakterisieren und zu untersuchen, ob sich diese während der Keimzellreifung verändern.

Durch immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von peroxisomalen Markerproteinen wie Katalase, Pmp70 oder Pex14 konnten wir zeigen, dass Peroxisomen in den Oozyten vorkommen und dass sich ihre Anzahl während der Follikelreifung deutlich vermehrt. Mit Hilfe eines GFP-PTS1-transgenen Mausstammes, in dessen Zellen die Peroxisomen durch das grün fluoreszierende Protein (GFP) markiert sind gelang es erstmals, oozytäre Peroxisomen auch elektronenmikroskopisch zu analysieren. Sie zeigen einen typischen Aufbau und sind in der Peripherie der Oozyten gelegentlich zu kleineren Gruppen zusammengelagert. Um die Funktionen dieser Peroxisomen näher zu charakterisieren haben wir Oozyten isoliert, die Expression von mRNAs für peroxisomale Proteine durch quantitative real-time PCR analysiert und mit der Expression dieser Gene im ganzen Ovar und der Leber als Referenzgewebe verglichen. Die Expression von Genen für Enzyme der etablierten Hauptfunktionen von Peroxisomen wie β -Oxidation oder ROS-Metabolismus war in den Oozyten im Vergleich zur Referenz deutlich vermindert. Die mRNAs für die Glyceronphosphat O-acyltransferase (Dhapat, Gnapat) und die Alkylglyceronphosphat Synthase (Dhap-S, Agps), zwei

Schlüsselenzyme der Etherlipidsynthese, die nur in Peroxisomen lokalisiert sind, war jedoch deutlich erhöht. Wir vermuten daher, dass die Synthese von Plasmalogenen, den häufigsten Etherlipiden, zu den spezifischen Funktionen der weiblichen Keimzellperoxisomen gehört. Eine vermehrte Plasmalogensynthese kann durch den erheblichen Membranzuwachs der Oozyte während der Follikelreifung, oder den erhöhten Membranbedarf bei den Furchungsteilungen während der frühen Embryonalentwicklung, erklärt werden. Oozytäre Lipidanalysen sind nun geplant, um die Bedeutung der peroxisomalen Plasmalogensynthese für die Reifung der Oozyten und die frühe Embryonalentwicklung genauer zu untersuchen.

Schlüsselwörter: Peroxisomen, Oozyte, Etherlipidsynthese, Immunfluoreszenz, real-time PCR

6.2 English Summary

Peroxisomes are cell organelles that range in size from 0.1 to 1.5 μm and are present in nearly all eukaryotic cells. They are involved in important functions of the intracellular metabolism of lipids and of reactive oxygen species (ROS). Peroxisomes are highly dynamic organelles that can adapt in shape and protein composition rapidly in response to metabolic demands. Depending on species or tissue type they have distinct functional profiles. However, to date nothing has been described about their function in female germ cells. The aim of this study was to characterize the peroxisomal compartment in mouse oocytes and to analyse possible alterations during oogenesis.

Our results obtained by immunofluorescence microscopic analysis of peroxisomal marker proteins like catalase, Pmp70 and Pex14, show the presence of peroxisomes in oocytes and their significant increase in number during folliculogenesis. We have also used a GFP-PTS1 transgenic mouse strain, whose peroxisomes are labelled by the green fluorescent protein (GFP). This allowed us to analyse the peroxisomes in these oocytes by electron and light microscopy. We could show that they have a typical ultrastructure and that they are sometimes arranged in small groups at the oocyte periphery. To characterize the cell type specific metabolic functions of these peroxisomes we isolated oocytes, analysed the levels of mRNAs encoding peroxisomal proteins by real-time PCR and compared the mRNA expression levels with the levels in total ovary and liver tissue. Relative expression levels of genes representing main functions of peroxisomal metabolism like β -oxidation and ROS-metabolism have been strongly reduced in oocytes compared to the reference. The mRNA levels for glyceronephosphate O-acyltransferase (Gnpat, Dhapat) and alkylglycerone phosphate synthase (Agps, Dhaps-S), however, were significantly increased. These are key enzymes involved in the biosynthesis of ether lipids that are exclusively localized in peroxisomes. We therefore suggest that the synthesis of plasmalogens, the most abundant ether lipids, is an important function of peroxisomes in female germ cells. This increased synthesis of plasmalogens could be explained by an increased need of membranes in the oocyte during folliculogenesis or during cleavage divisions in

early embryogenesis. Future studies will focus on lipid analysis of oocytes. This will further clarify the physiological role of peroxisomal plasmalogen biosynthesis in the maturation process of oocytes and early embryogenesis.

Keywords: peroxisome, oocyte, ether lipids, immunofluorescence,
real-time PCR

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwachter H, Rehling P, Sickmann A, Meyer HE, Girzalsky W, Kunau WH (2003) Pex8p: an intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* 11: 635-46
- Angermuller S, Bruder G, Volkl A, Wesch H, Fahimi HD (1987) Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur J Cell Biol* 45: 137-44
- Antonenkova VD (1989) Dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem* 183: 75-82
- Antonenkova VD, Van Veldhoven PP, Waelkens E, Mannaerts GP (1999) Comparison of the stability and substrate specificity of purified peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolases A and B from rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1437: 136-41
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics* 21: 389-95
- Bleil JD, Wassarman PM (1980) Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* 76: 185-202
- Bock P (1972) [Peroxisomes in the mouse ovary]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 133: 131-40
- Bogner K, Hinsch KD, Nayudu P, Konrad L, Cassara C, Hinsch E (2004) Localization and synthesis of zona pellucida proteins in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) ovary. *Mol Hum Reprod* 10: 481-8

- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128: 617-30
- Brown LA, Baker A (2008) Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (review). *Mol Membr Biol* 25: 363-75
- Camp TA, Rahal JO, Mayo KE (1991) Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5: 1405-17
- Carvalho AF, Pinto MP, Grou CP, Alencastre IS, Fransen M, Sa-Miranda C, Azevedo JE (2007) Ubiquitination of mammalian Pex5p, the peroxisomal import receptor. *J Biol Chem* 282: 31267-72
- Croes K, Casteels M, De Hoffmann E, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP (1996) alpha-Oxidation of 3-methyl-substituted fatty acids in rat liver. Production of formic acid instead of CO₂, cofactor requirements, subcellular localization and formation of a 2-hydroxy-3-methylacyl-CoA intermediate. *Eur J Biochem* 240: 674-83
- De Duve C, Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46: 323-57
- De Duve C, Beaufay H, Jacques P, Rahman-Li Y, Sellinger OZ, Wattiaux R, De Coninck S (1960) Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 40: 186-7
- De Felici M (2010) Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Mol Hum Reprod*
- Dean M, Annilo T (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 123-42

- Dieuaide M, Novikov DK, Carchon H, Van Veldhoven PP, Mannaerts GP (1996) Substrate stereospecificities of rat liver peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases. *Ann N Y Acad Sci* 804: 680-1
- Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW, Kiel JA, Kunau WH, Lazarow PB, Mannaerts GP, Moser HW, Osumi T, Rachubinski RA, Roscher A, Subramani S, Tabak HF, Tsukamoto T, Valle D, van der Klei I, van Veldhoven PP, Veenhuis M (1996) A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol* 135: 1-3
- Dodt G, Gould SJ (1996) Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor. *J Cell Biol* 135: 1763-74
- Droge W (2003) Oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol* 543: 191-200
- Epifano O, Liang LF, Familiar M, Moos MC, Jr., Dean J (1995) Coordinate expression of the three zona pellucida genes during mouse oogenesis. *Development* 121: 1947-56
- Ermak G, Davies KJ (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol* 38: 713-21
- Figuerola C, Kawada ME, Veliz LP, Hidalgo U, Barros C, Gonzalez S, Santos MJ (2000) Peroxisomal proteins in rat gametes. *Cell Biochem Biophys* 32 Spring: 259-68
- Fransen M, Brees C, Baumgart E, Vanhooren JC, Baes M, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP (1995) Identification and characterization of the putative human peroxisomal C-terminal targeting signal import receptor. *J Biol Chem* 270: 7731-6

- Gartner J (2000) Organelle disease: peroxisomal disorders. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3: S236-9
- Girzalsky W, Platta HW, Erdmann R (2009) Protein transport across the peroxisomal membrane. *Biol Chem* 390: 745-51
- Glover JR, Andrews DW, Rachubinski RA (1994) *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10541-5
- Goldman BM, Blobel G (1978) Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5066-70
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *J Cell Biol* 108: 1657-64
- Gould SJ, Valle D (2000) Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet* 16: 340-5
- Hijikata M, Wen JK, Osumi T, Hashimoto T (1990) Rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase gene. Occurrence of two closely related but differentially regulated genes. *J Biol Chem* 265: 4600-6
- Hogenboom S, Tuyp JJ, Espeel M, Koster J, Wanders RJ, Waterham HR (2004a) Human mevalonate pyrophosphate decarboxylase is localized in the cytosol. *Mol Genet Metab* 81: 216-24
- Hogenboom S, Tuyp JJ, Espeel M, Koster J, Wanders RJ, Waterham HR (2004b) Mevalonate kinase is a cytosolic enzyme in humans. *J Cell Sci* 117: 631-9
- Hogenboom S, Tuyp JJ, Espeel M, Koster J, Wanders RJ, Waterham HR (2004c) Phosphomevalonate kinase is a cytosolic protein in humans. *J Lipid Res* 45: 697-705

- Huhse B, Rehling P, Albertini M, Blank L, Meller K, Kunau WH (1998) Pex17p of *Saccharomyces cerevisiae* is a novel peroxin and component of the peroxisomal protein translocation machinery. *J Cell Biol* 140: 49-60
- Keller GA, Barton MC, Shapiro DJ, Singer SJ (1985) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase is present in peroxisomes in normal rat liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 770-4
- Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK (2002) Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog Lipid Res* 41: 369-91
- Lazarow PB (1978) Rat liver peroxisomes catalyze the beta oxidation of fatty acids. *J Biol Chem* 253: 1522-8
- Lazarow PB, De Duve C (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2043-6
- Lazarow PB, Fujiki Y (1985) Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1: 489-530
- Luers GH, Thiele S, Schad A, Volkl A, Yokota S, Seitz J (2006) Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol* 125: 693-703
- Mamo S, Gal AB, Bodo S, Dinnyes A (2007) Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol* 7: 14
- Mamo S, Gal AB, Polgar Z, Dinnyes A (2008) Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol* 9: 67

- Masters C (1997) Gluconeogenesis and the peroxisome. *Mol Cell Biochem* 166: 159-68
- McNew JA, Goodman JM (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* 127: 1245-57
- Moser HW (1993) Peroxisomal diseases. *Adv Hum Genet* 21: 1-106, 443-51
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
- Munn NJ, Arnio E, Liu D, Zoeller RA, Liscum L (2003) Deficiency in ethanolamine plasmalogen leads to altered cholesterol transport. *J Lipid Res* 44: 182-92
- Nagan N, Zoeller RA (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40: 199-229
- Nenicu A, Luers GH, Kovacs W, David M, Zimmer A, Bergmann M, Baumgart-Vogt E (2007) Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod* 77: 1060-72
- Opperdoes FR (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 41: 127-51
- Oshino N, Chance B, Sies H, Bucher T (1973) The role of H₂O₂ generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Arch Biochem Biophys* 154: 117-31
- Paillisson A, Dade S, Callebaut I, Bontoux M, Dalbies-Tran R, Vaiman D, Monget P (2005) Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. *BMC Genomics* 6: 76

- Pedersen JI (1993) Peroxisomal oxidation of the steroid side chain in bile acid formation. *Biochimie* 75: 159-65
- Pedersen T, Peters H (1968) Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 17: 555-7
- Petriv OI, Tang L, Titorenko VI, Rachubinski RA (2004) A new definition for the consensus sequence of the peroxisome targeting signal type 2. *J Mol Biol* 341: 119-34
- Platta HW, El Magraoui F, Schlee D, Grunau S, Girzalsky W, Erdmann R (2007) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *J Cell Biol* 177: 197-204
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK (2006) Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1413-26
- Rankin T, Dean J (2000) The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* 5: 114-21
- Rhodin J (1954) Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells in the mouse kidney., PhD thesis Karolinska Institute, Aktiebolaget, Godvil, Stockholm, Schweden
- Robbi M, Lazarow PB (1982) Peptide mapping of peroxisomal catalase and its precursor. Comparison to the primary wheat germ translation product. *J Biol Chem* 257: 964-70
- Rodemer C, Thai TP, Brugger B, Kaercher T, Werner H, Nave KA, Wieland F, Gorgas K, Just WW (2003) Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum Mol Genet* 12: 1881-95

- Rokka A, Antonenkov VD, Soininen R, Immonen HL, Pirila PL, Bergmann U, Sormunen RT, Weckstrom M, Benz R, Hiltunen JK (2009) Pxmp2 is a channel-forming protein in Mammalian peroxisomal membrane. *PLoS One* 4: e5090
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91
- Saran M (2003) To what end does nature produce superoxide? NADPH oxidase as an autocrine modifier of membrane phospholipids generating paracrine lipid messengers. *Free Radic Res* 37: 1045-59
- Schrader M, Fahimi HD (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122: 383-93
- Schrader M, Fahimi HD (2006) Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1755-66
- Seedorf U, Brysch P, Engel T, Schrage K, Assmann G (1994) Sterol carrier protein X is peroxisomal 3-oxoacyl coenzyme A thiolase with intrinsic sterol carrier and lipid transfer activity. *J Biol Chem* 269: 21277-83
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 18: 739-73
- Singh AK, Dhaunsi GS, Gupta MP, Orak JK, Asayama K, Singh I (1994) Demonstration of glutathione peroxidase in rat liver peroxisomes and its intraorganellar distribution. *Arch Biochem Biophys* 315: 331-8
- Singh AK, Dobashi K, Gupta MP, Asayama K, Singh I, Orak JK (1999) Manganese superoxide dismutase in rat liver peroxisomes: biochemical and immunochemical evidence. *Mol Cell Biochem* 197: 7-12

- Singh H, Beckman K, Poulos A (1993) Exclusive localization in peroxisomes of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase and alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase in rat liver. *J Lipid Res* 34: 467-77
- Singh I, Moser AE, Goldfischer S, Moser HW (1984) Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 4203-7
- Sinowatz F, Topfer-Petersen E, Kolle S, Palma G (2001) Functional morphology of the zona pellucida. *Anat Histol Embryol* 30: 257-63
- Siraki AG, Pourahmad J, Chan TS, Khan S, O'Brien PJ (2002) Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 32: 2-10
- Soyal SM, Amleh A, Dean J (2000) FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127: 4645-54
- Stolz DB, Zamora R, Vodovotz Y, Loughran PA, Billiar TR, Kim YM, Simmons RL, Watkins SC (2002) Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology* 36: 81-93
- Tabak HF, Murk JL, Braakman I, Geuze HJ (2003) Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum. *Traffic* 4: 512-8
- Thai TP, Heid H, Rackwitz HR, Hunziker A, Gorgas K, Just WW (1997) Ether lipid biosynthesis: isolation and molecular characterization of human dihydroxyacetonephosphate acyltransferase. *FEBS Lett* 420: 205-11
- Van den Munckhof RJ, Denyn M, Tigchelaar-Gutter W, Schipper RG, Verhofstad AA, Van Noorden CJ, Frederiks WM (1995) In situ substrate specificity and ultrastructural localization of polyamine oxidase activity in unfixed rat tissues. *J Histochem Cytochem* 43: 1155-62

- van Roermund CW, Visser WF, Ijlst L, van Cruchten A, Boek M, Kulik W, Waterham HR, Wanders RJ (2008) The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters. *FASEB J* 22: 4201-8
- Vanhooren JC, Marynen P, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP (1997) Evidence for the existence of a pristanoyl-CoA oxidase gene in man. *Biochem J* 325 (Pt 3): 593-9
- Volkl A, Baumgart E, Fahimi HD (1988) Localization of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J Histochem Cytochem* 36: 329-36
- Wanders RJ, Komen JC (2007) Peroxisomes, Refsum's disease and the alpha- and omega-oxidation of phytanic acid. *Biochem Soc Trans* 35: 865-9
- Wanders RJ, Waterham HR (2006a) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu Rev Biochem* 75: 295-332
- Wanders RJ, Waterham HR (2006b) Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1707-20
- Wang S, Kou Z, Jing Z, Zhang Y, Guo X, Dong M, Wilmut I, Gao S (2010) Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 17639-44
- Wierzbicki AS (2007) Peroxisomal disorders affecting phytanic acid alpha-oxidation: a review. *Biochem Soc Trans* 35: 881-6
- Yan C, Pendola FL, Jacob R, Lau AL, Eppig JJ, Matzuk MM (2001) Oosp1 encodes a novel mouse oocyte-secreted protein. *Genesis* 31: 105-10
- Yoshida M, Sanbuisyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A (2009) Morphological characterization of the ovary under normal cycling

in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. J Toxicol Sci 34
Suppl 1: SP189-97

8. ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
β-ME	β-Mercaptoethanol
A	Adenosin
A.a.i.	Aqua ad iniectabilia
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Aqua dest.	aqua destillata
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
C	Cytidin
C-	Kohlenstoffatom
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CHO	chinese hamster ovary
C-Terminus	Carboxyterminus
CT-Wert	Cycle Treshold
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAPI	4,2-diamino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid

etc.	et cetera
EZM	extrazelluläre Matrix
g	Gramm
G	Guanosin
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
i.d.R.	in der Regel
IRD	infantiler Morbus Refsum
l	Liter
m	Meter
mA	Milliampere
min	Minute
mol	Mol
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NALD	Adrenoleukodystrophie
NaN ₃	Natriumazid
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
O ₂	Sauerstoff
OsO ₄	Osmiumtetroxid
PBD	peroxisome biogenesis disorder
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
PTS	peroxisomales „targeting“ Signal
QPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RCDP	Rhizomelia chondrodysplasia punctata
RNA	Ribonucleinsäure
RNS	reactive nitrogen species

ROS	reactive oxygen species
sec	Sekunde
SEM	standard error of the mean
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
U	Unit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
VLCFA	very long chain fatty acids
z.B.	zum Beispiel
ZS	Zellweger-Syndrom

Vielfache und Fraktionen:

G	Giga-	10^9
M	Mega-	10^6
K	Kilo-	10^3
m	Milli-	10^{-3}
μ	Mikro-	10^{-6}
n	Nano-	10^{-9}
p	Pico-	10^{-12}

8.2 Wertetabelle QPCR

mRNA	Mittelwert			SEM			P-Wert			$2^{-\Delta(\text{celtsc}-\text{delta}ct)}$			SEM _E		
	Leber	Ovar	Oozyten	Leber	Ovar	Oozyten	Leber	Ovar	Oozyten	Leber	Ovar	Oozyten	Leber	Ovar	Oozyten
Lhcgr	20,82	7,15	11,85	1,24	0,07	0,18	0,0022	Referenz	0,0022	0,000	1,000	0,038	0,000	0,049	0,005
Fshr	25,61	9,50	12,16	0,61	0,07	0,15	0,0022	Referenz	0,0022	0,000	1,000	0,158	0,000	0,049	0,016
Zp1	26,54	10,31	3,84	0,32	0,07	0,05	0,0022	Referenz	0,0022	0,000	1,000	88,647	0,000	0,049	3,072
Oosp1	24,19	7,74	0,30	1,78	0,02	0,02	0,0022	Referenz	0,0022	0,000	1,000	174,248	0,000	0,014	2,416
Cat (a)	-0,84	3,91	6,02	0,14	0,16	0,20	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,037	0,009	0,097	0,004	0,001
Cat (b)	0,31	4,92	7,40	0,10	0,09	0,07	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,041	0,007	0,069	0,003	0,000
Sod2	4,29	5,94	6,41	0,15	0,17	0,02	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,319	0,230	0,104	0,038	0,003
Gpx1	-0,56	2,82	4,94	0,11	0,21	0,05	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,096	0,022	0,076	0,014	0,001
Gstk1	2,68	5,81	6,46	0,03	0,04	0,03	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,114	0,073	0,021	0,003	0,002
Pex3	8,92	9,65	8,32	0,08	0,13	0,06	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,603	1,516	0,055	0,054	0,063
Pex5	4,75	5,55	5,41	0,16	0,23	0,05	Referenz	0,0545	0,0043	1,000	0,574	0,633	0,111	0,092	0,022
Pex7	10,41	12,06	10,85	0,16	0,30	0,14	Referenz	0,0022	0,1300	1,000	0,319	0,737	0,111	0,066	0,072
Pex14	6,23	6,69	4,80	0,18	0,22	0,03	Referenz	0,1800	0,0022	1,000	0,727	2,694	0,125	0,111	0,056
Pex19	8,87	9,09	8,81	0,09	0,11	0,07	Referenz	0,2400	0,6300	1,000	0,859	1,042	0,062	0,065	0,051
Aox	3,45	7,63	9,76	0,12	0,27	0,29	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,055	0,013	0,083	0,010	0,003
Acox2	8,22	15,26	16,05	0,05	0,76	0,39	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,008	0,004	0,035	0,004	0,001
Pbe	5,28	11,43	14,20	0,10	0,32	0,30	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,014	0,002	0,069	0,003	0,000
Mfp2	5,42	7,48	7,20	0,13	0,17	0,09	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,240	0,291	0,090	0,028	0,018
Thio A	8,90	9,77	11,20	0,06	0,13	0,10	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,547	0,203	0,042	0,049	0,014
Thio B	11,73	19,06	17,54	0,08	0,09	0,17	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,006	0,018	0,055	0,000	0,002
Dhapat	5,79	5,83	5,55	0,03	0,17	0,04	Referenz	0,9990	0,0022	1,000	0,973	1,181	0,021	0,115	0,033
Dhap-S	9,07	7,65	6,36	0,29	0,20	0,08	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	2,676	6,543	0,201	0,371	0,363
Pxmp2	3,45	9,55	6,32	0,12	0,08	0,08	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,015	0,137	0,083	0,001	0,008
Abcd3	2,61	5,73	5,61	0,04	0,22	0,08	Referenz	0,0022	0,0022	1,000	0,115	0,125	0,028	0,018	0,007
Abcd1	5,96	6,23	6,40	0,11	0,28	0,09	Referenz	0,8200	0,0150	1,000	0,829	0,737	0,076	0,161	0,044

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Klassifizierung der Oozyten	13
Abb. 3.1:	Herstellung GFP-PTS1-transgener Mäuse	17
Abb. 3.2:	Übersicht Maussitus (Foto G. Jennemann/H. Fleischer)	22
Abb. 3.3:	Anordnung der Ovarien im Paraffin-Block	24
Abb. 3.4:	Schema Oozyten-Isolation	37
Abb. 3.5:	Picken der Oozyten	38
Abb. 3.6:	Schema PCR Amplifizierung	41
Abb. 4.1:	H.E.-Färbungen Ovar	53
Abb. 4.2:	Vergleich Perfusionsfixierung und Immersionsfixierung	57
Abb. 4.3:	Kontrollen der Immunfluoreszenz	58
Abb. 4.4:	Antikörperabhängiger Nachweis von Peroxisomen	60
Abb. 4.5:	Stadienabhängiger Nachweis von Peroxisomen	62
Abb. 4.6:	Kolokalisation Ak und GFP	64
Abb. 4.7:	Ultrastruktur von Peroxisomen in reifen Oozyten	65
Abb. 4.8:	Exemplarische Darstellung einer Schmelzkurvenanalyse	67
Abb. 4.9:	Gelbild zum Nachweis Oozyten-spezifischer und nicht oozytärer Gene	69
Abb. 4.10:	Quantifizierung der Oozyten-Anreicherung mittels QPCR	70
Abb. 4.11:	Quantifizierung der Oozyten-Verunreinigung mittels QPCR	71
Abb. 4.12:	Gelbilder zum Nachweis peroxisomaler Gene	73
Abb. 4.13:	Quantifizierung des ROS-Metabolismus mittels QPCR	75
Abb. 4.14:	Quantifizierung der peroxisomalen Biogenese mittels QPCR	77
Abb. 4.15:	Quantifizierung des oxidativen Stoffwechsels mittels QPCR	79
Abb. 4.16:	Quantifizierung der Etherlipidsynthese mittels QPCR	80
Abb. 4.17:	Quantifizierung der Membranproteine mittels QPCR	82

8.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	ROS abbauende Enzyme	5
Tab. 3.1:	Chemikalien	17
Tab. 3.2:	Verbrauchsmaterialien	19
Tab. 3.3:	Kits	19
Tab. 3.4:	Geräte	19
Tab. 3.5:	Verspüllösung	21
Tab. 3.6:	4 % PFA	22
Tab. 3.7:	Phosphate Buffered Saline (PBS)	22
Tab. 3.8:	Bouin-Fixierung	23
Tab. 3.9:	Alkoholreihe zum Auswaschen, Entwässern und Intermedium	23
Tab. 3.10:	Sucrose-Lösungen	25
Tab. 3.11:	Chromalaun-Gelatine	26
Tab. 3.12:	H.E.-Färbung	27
Tab. 3.13:	Primärantikörper	28
Tab. 3.14:	Erster Tag Immunfluoreszenzmarkierung Paraffin	30
Tab. 3.15:	0,005 % Tween 20 / Triton-X-100 in PBS	31
Tab. 3.16:	Zweiter Tag Immunfluoreszenzmarkierung	31
Tab. 3.17:	Erster Tag Immunfluoreszenzmarkierung Kryoschnitte	32
Tab. 3.18:	Elektronenmikroskopie Fixans 1	33
Tab. 3.19:	Elektronenmikroskopie Fixans 2	34
Tab. 3.20:	TTBS-Puffer	34
Tab. 3.21:	Protokoll cDNA-Synthese	39
Tab. 3.22:	Reaktionsansatz PCR (50 µl)	42
Tab. 3.23:	Programm PCR	42
Tab. 3.24:	90 ml 2 % Agarosegel	43
Tab. 3.25:	5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	44
Tab. 3.26:	6x Ladepuffer	44
Tab. 3.27:	Reaktionsansatz QPCR (25 µl)	45
Tab. 3.28:	SYBR Green Mastermix (19 µl)	45
Tab. 3.29:	Programm QPCR	46

Tab. 3.30:	Primer (alphabetisch)	47
Tab. 4.1:	optimale Antikörperkonzentrationen	55
Tab. 4.2:	Primer Oozyten-Anreicherung (alphabetisch)	68
Tab. 4.3:	Primer Oozyten-Verunreinigung (alphabetisch)	70
Tab. 4.4:	Primer ROS-Metabolismus (alphabetisch)	74
Tab. 4.5:	Primer peroxisomale Biogenese (alphabetisch)	75
Tab. 4.6:	Primer Oxidation (alphabetisch)	77
Tab. 4.7:	Primer Etherlipidsynthese (alphabetisch)	79
Tab. 4.8:	Primer Membranproteine (alphabetisch)	81

8.5 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bien, Braulke, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dietrich, Dominguez, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eickmann, Eilers, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fritz, Garn, Garten, Geks, Gemsa, Gerdes, Gress, Grzeschik, Gudermann, Haberhausen, Hasilik, Hemmeter, Hertl, Hofmann, Hörle, Hoyer, Jacob, Kalder, Kalinowski, Kann, Klenk, Klose, Koolmann, Koop, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Langer, Leonhardt, Lill, Liß, Loff, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Maisner, Mandrek, Meißner, Mennel, Mittag, Moll, Moosdorf, Mühlberger, Mueller, Müller, Müller-Brüsselbach, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oertel, Opitz, Pagenstecher, Pieper, Plant, Preisig-Müller, Quante, Ramaswamy, Reese, Renz, Roeper, Röhm, Rogosch, Rominger, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schuh, Schwarz, Seitz, Sesterhenn, Sommer, Steiniger, Straßmann, Stempel, Sure, Suske, Tackenberg, Tebbe, Vogelmeier, Vogt, Voigt, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Westermann, Westhoff, Wulf, Zemlin, Ziorek.

Meine akademischen Lehrer waren Herren in Gießen:

Dettmeyer, Riße, Schneider.

8.6 Tabellarischer Lebenslauf

Die Seiten 115-116 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8.7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Seitz möchte ich für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Georg H. Lüers. Er hat mir während meiner gesamten Promotion bei der Planung der Versuche und der Anleitung zu wissenschaftlichem Arbeiten stets hilfsbereit zur Seite gestanden. Ebenso möchte ich mich für die konstruktiven Diskussionen, die immer neuen Ideen für weiterführende Versuchsansätze, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie des gesamten Instituts, die auf die unterschiedlichsten Weisen am Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben, sei für die stets konstruktive Arbeitsatmosphäre gedankt. Insbesondere möchte ich mich bei Andrea Cordes, bei Gerhard Jennemann und bei Elke Völk-Badouin bedanken.

Für die problemlose Möglichkeit der Durchführung der QPCR in ihrem Labor möchte ich Prof. Dr. U.-M. Bauer aus dem IMT Marburg und Dr. Susanne Weber sowie den Mitarbeitern der AG Bauer, für ihre nicht selbstverständliche Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken.

Ich danke meinen Kommilitoninnen Stefanie Kungl und Nina Kothe für die stets informativen Diskussionen während meines Studiums.

Meiner Freundin Jennifer Philipp danke ich für einfach ALLES!

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Gabriele und Martin Fleischer, sowie meinem Bruder Moritz. Auf ihre Unterstützung in allen Lebensbereichen konnte ich stets bauen und sie haben mir, nicht zuletzt auch durch ihre finanzielle Unterstützung, ein sorgenfreies Studium erst ermöglicht.

8.8 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**Funktionelle Charakterisierung von Peroxisomen
in murinen Oozyten**

im Institut für Anatomie und Zellbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. J. Seitz mit Unterstützung durch Prof. Dr. G. H. Lüers ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 28.11.2010

Hendrik Fleischer